

RIJKSLANDBOUWPROEFSTATION TE GRONINGEN

EEN ONDERZOEK NAAR DE BRUIKBAARHEID VAN DE ASPERGILLUS-METHODE VOOR DE BEPALING VAN PHOSPHORZUUR EN KALI IN DEN GROND

DOOR

F. C. GERRETSEN EN NORA BLUMENDAL

INLEIDING

Het streven om de landbouwers voor te lichten betreffende de mestbehoefte van hun akkers, zal gericht moeten zijn op een zoo goedkoop en vlug mogelijke uitvoering van de noodige bepalingen.

De chemische bepalingen, in het bijzonder wat betreft de kali-, de magnesium- en de koperbehoefte, beantwoorden aan dezen eisch veelal niet in die mate als wenschelijk zou zijn; zij zijn betrekkelijk ingewikkeld en daardoor vanzelfsprekend ook kostbaar.

Langs verschillende wegen heeft men getracht hierin verandering te brengen; de eenvoudigste methode lijkt wel die te zijn, waarbij men in een experiment van korten duur de plant zelf de benodigde voedingsstoffen uit den grond laat halen, hetgeen zooals bekend, het principe van de kiemplanten-methode van NEUBAUER is. Hierbij moet echter toch weer het gehalte aan kali, phosphor, magnesium etc. van de kiemplantjes chemisch of spectrografisch bepaald worden, wat evenmin eenvoudig te noemen is.

Het eenigszins fantastische denkbeeld om bij de bepaling van de plantenvoedingstoffen in den grond den chemicus door een schimmel te vervangen, was reeds in 1909 door den Russischen onderzoeker BUTKEWITSCH (1) naar voren gebracht. In samenwerking met KOSZELEZKY had hij aangetoond, dat het myceliumgewicht van de schimmel *Aspergillus niger* op zeer regelmatige wijze toenam met de hoeveelheden K of P, die in de overigens zoo volledig mogelijke voedingsvloeistof aanwezig waren.

Aan deze belangrijke onderzoekingen is echter geruimen tijd niet de minste aandacht geschonken. Eerst in 1924 werd door SCHNÜCKE (2) een onderzoek verricht over de phosphaatstofwisseling van eenige schimmels; daarna is door NIETHAMMER (3) gewerkt over den invloed van de stikstof-, kali-, en phosphorvoorziening op den groei van *Aspergillus*, terwijl door BENECKE en SÖDING (4) in 1927 nogmaals de aandacht gevestigd werd op de mogelijkheid om de mestbehoefte van den grond met behulp van *Aspergillus niger* te bepalen.

Nadat aldus de weg tot practische toepassing geplaveid was, is door NIKLAS

en medewerkers (5) de methode dusdanig uitgewerkt en verbeterd, dat zij inderdaad bij het practisch bodemonderzoek kon worden aangewend en zij zich onder de bestaande methoden een plaats heeft kunnen veroveren.

Het principe, waarop de methode berust, is, dat de groei van een organisme in de eerste plaats bepaald wordt door den factor, die ten opzichte van de andere groeifactoren in het minimum is. Dit verband is echter niet zoo eenvoudig als door de zgn. wet van het minimum van LIEBIG wordt voorgesteld.

Dat de opbrengst van een organisme niet alleen bepaald wordt door de hoeveelheid van een voedingsstof, die in het minimum is, doch mede ook van de hoeveelheden en de onderlinge verhoudingen der andere voedingsstoffen afhangt, werd het eerst door LIEBSCHER in 1895 (6) voor de plant geformuleerd in zijn wet van het optimum; het was PRINGSHEIM (7), die in 1914 aan de hand van proeven met de schimmel *Aspergillus niger* vaststelde, dat ook de opbrengst van dit organisme niet alleen bepaald wordt door de hoeveelheid van een voedingsstof, die in het minimum is, doch, zoo zegt hij: „*seine Ausnutzung, und damit die Produktionssteigerung ist aber von der Menge der anderen Nährstoffe abhängig*”.

De mathematische formuleering van het verband tusschen opbrengst en groeifactoren door MITSCHERLICH geeft ook voor *Aspergillus niger* geen nauwkeurig beeld van hetgeen in werkelijkheid gebeurt, zooals o.m. door MEYER (8) overtuigend is aangetoond. Volgens MITSCHERLICH zouden wel is waar bij verbetering van de overige factoren hogere opbrengsten worden verkregen, de maxima van dergelijke opeenvolgende krommen zouden echter bij constante K, P of N gehalten van het cultuurmedium moeten liggen. Door verschillende onderzoekers van het Rijkslandbouwproefstation te Groningen (9 t/m 12) is naar voren gebracht, dat zich in dit verband drie mogelijkheden voordoen, n.l. de maxima verplaatsen zich naar hooger waarde van den beschouwden groeifactor, of zij behouden hun oorspronkelijke plaats, of wel zij verschuiven naar lagere waarden van den beschouwden groeifactor. Hieraan moet nog worden toegevoegd de mogelijkheid, dat zij aanvankelijk in de eene en naderhand in de andere richting verschuiven, zooals door MEYER (13) voor *Aspergillus* is aangetoond.

Ook spreekt het vanzelf, dat de opbrengst van een levend organisme een zeer gecompliceerde grootheid is, waarvan bepaalde onderdeelen wel, andere niet of in veel mindere mate door verandering van een bepaalden groeifactor beïnvloed kunnen worden. Zoo bleek b.v., dat bij een onzer entingsproeven met lucerne te Nieuw-Beerta (14) de totale opbrengst aan droge stof door enting met knolletjes-bacteriën met 7,5 % vermeerderd was, de eiwitopbrengst daarentegen met 37,5 % was toegenomen. In den loop van dit onderzoek is het ons gebleken, dat ook de *Aspergillus*, wat betreft het fosphaatgehalte

van het mycelium, bij stijgende P_2O_5 -concentratie van het cultuurmedium dergelijke eigenaardigheden vertoont. Het hoogste P_2O_5 -gehalte van het mycelium (0,31 %) werd gevonden bij het laagste P_2O_5 -gehalte van de vloeistof (0,002 %). Bij stijgende P_2O_5 -concentratie van de vloeistof *daalt* het P_2O_5 -gehalte van het mycelium tot een minimum (0,23 %), om tenslotte bij nog hogere concentraties weer een maximum te naderen (0,30 %). Elk organisme heeft blijkbaar een zeker aanpassingsvermogen aan bepaalde toestanden, wat ten gevolge kan hebben, dat bij een gelijk opbrengstgewicht, de procentische samenstelling van de droge stof tusschen zekere grenzen kan schommelen. Hoe grooter dit aanpassingsvermogen en hoe wijder deze grenzen, des te minder geschikt is het organisme voor de bepaling van de voedingsstoffen in den grond.

Een van de voordeelen bij het gebruik van schimmels is, dat zij zich in dit opzicht gunstig van de hogere planten onderscheiden, terwijl men bovendien de uiterlijke groeiomstandigheden veel meer in de hand heeft; de temperatuur wordt nauwkeurig constant gehouden, er is een vaste verhouding tusschen het met mycelium begroeide oppervlak en het volumen van de voedingsvloeistof, de hoeveelheid en de toestand van het entmateriaal is steeds dezelfde enz.

Aan de moeilijkheden, die zich ook bij de Aspergillus-methode voordoen bij de interpretatie van de verkregen myceliumopbrengsten en die voor een deel voortkomen uit het feit, dat in sommige gronden, buiten de te bepalen meststoffen, stoffen aanwezig zijn, die den groei van de schimmel stimuleeren, zal in hooge mate tegemoet gekomen kunnen worden, wanneer de samenstelling van het voedingsmedium zelf reeds een maximale groei van de schimmel mogelijk maakt.

NIKLAS en medewerkers hebben dit ook ingezien en er naar gestreefd, dat de door hen gebruikte voedingsoplossing de schimmel de gunstigste groeiomstandigheden biedt en wel zoodanig, „dass selbst der Zusatz verschiedener Böden, trotz der in ihnen enthaltenen Nähr- und Reizstoffe, auf die Entwicklung und Ernte des Pilzes keinen wesentlichen Einfluss mehr auszuüben vermag” (15).

Bij onze onderzoekingen bleek echter, dat de door NIKLAS en medewerkers samengestelde voedingsvloeistof aan deze principieel te stellen eisch niet voldoet. Door TRISCHLER (16) en ook door VILSMEYER (17) was al gewezen op de vrij groote pH-veranderingen, die tijdens den groei van de schimmel in de voedingsvloeistof optreden. Vooral voor de fosphaatbepaling is dit ongewenscht, aangezien de hoeveelheid fosphaat, die uit den grond in oplossing gaat, zeer van de pH afhankelijk is. Door SÖDING (18) was dit reeds als een ernstige tekortkoming van de methode beschouwd.

Verder was door NIKLAS c.s. (19) zelf reeds geconstateerd, dat het kalk-

gehalte van den grond de myceliumgewichten sterk beïnvloedt, niet alleen door de bufferende werking, doch ook doordat Ca een voedingsstof is. Op Ca-houdende gronden krijgt men veel te hoge waarden, ook al wordt het CaCO_3 met citroenzuur geneutraliseerd. Deze moeilijkheid wordt noch door NIKLAS (19), noch door het daaropvolgende onderzoek van VILSMAYER (17) ook maar eenigermate afdoende opgelost, integendeel wordt door het voorstel, om op grond van uitgebreid proefmateriaal voor zulke gevallen empirische waarden vast te stellen, de geheele methode op losse schroeven gezet.

Verder was door KIESZLING (20) de aandacht gevestigd op het feit, dat door toevoeging van 0,5 % huminezuur aan de te onderzoeken gronden in sommige gevallen de myceliumgewichten kunnen stijgen met bedragen variërend van 3,3—50,5 %. Waar dit het geval is, spreekt het vanzelf, dat aan de Aspergillismethode ernstige fouten moeten kleven en dat, alhoewel de methode in een aantal gevallen, speciaal wat betreft de kalibepaling, hoopvolle resultaten gaf, de kans op foutieve waarden door de hierboven aangegeven oorzaken te groot was, om de methode zonder meer in de praktijk toe te passen.

Het doel van ons onderzoek is geweest na te gaan of het mogelijk was de samenstelling van het voedingsmedium dusdanig te wijzigen, dat deze inderdaad aan de te stellen eischen voldoet. Tevens is nagegaan of de gronden, zooals die in ons land doorgaans voorkomen, zich in het algemeen voor de toepassing der methode leenen. Niet alleen moest de methode wat haar betrouwbaarheid en reproduceerbaarheid betreft met de bestaande methoden vergeleken worden, maar tevens was het noodig een indruk te hebben van den tijdsduur en de kosten, die aan een dergelijke methodiek verbonden zijn, alvorens het mogelijk zou zijn een oordeel uit te spreken over de vraag of in ons land aan de Aspergillus-methode bij het grondonderzoek voor de praktijk al dan niet een plaats zou moeten worden ingeruimd.

A. DE PHOSPHAATBEPALING

I. Methodiek

De methodiek van de fosphaatbepaling in grond met behulp van *Aspergillus niger*, welke in 1930 door NIKLAS, POSCHENRIEDER en TRISCHLER (1) was uitgewerkt, voldeed niet aan de eischen, die men aan een eenigermate betrouwbare methode stellen moet. Door VILSMAYER (2) werd hierin geen

¹) H. NIKLAS, H. POSCHENRIEDER en J. TR. „Eine mikrobiologische Methode zur Feststellung der Düngebedürftigkeit der Böden. *Z. Pfl. Ern. Düng. u. Bodenk.* A 18, p. 129 van 1930.

²) G. VILSMAYER. Der Einfluss des Kalkgehaltes der Böden bei der Prüfung auf ihre Phosphorsäurebedürftigkeit mittels *Aspergillus niger*. *Z. Pfl. Ern. Düng.* A 31. p. 279, 1933.

verbetering gebracht. Het voornaamste bezwaar bestond wel in het feit, dat de pH-veranderingen, die in de gebruikte voedingsoplossing optraden, groot waren en bovendien van het fosphaatgehalte afhankelijk waren. De waarden, waartusschen de door deze onderzoekers verkregen eind-pH's schommelen, liggen tusschen 3,5 en 1,3. Tevens zijn de myceliumopbrengsten niet alleen van het fosphaatgehalte afhankelijk, maar bovendien van het CaCO_3 -gehalte van het cultuurmedium (zie VILSMEYER l.c.p. 282). NIKLAS e.s. ¹⁾ beperken zich ook tot het onderzoek van humusvrije gronden zonder kalk, waardoor de methode voor het practisch grondonderzoek geen perspectieven opent.

Door SÖDING (l.c.) was reeds voorgeslagen de pH-veranderingen zoo klein mogelijk te maken door *Aspergillus*-stammen te gebruiken, die op een kleinere zuurvorming geselecteerd waren.

Hoopvoller leek het om systematisch te onderzoeken, door welke veranderingen in de samenstelling van de cultuurvloeistof aan de reeds genoemde bezwaren zou kunnen worden tegemoet gekomen.

Daarnevens zou kunnen worden geprobeerd, hetzij de gebruikelijke *Aspergillus*-stam aan de nieuwe cultuurvloeistof te doen aanpassen, of een andere *Aspergillus*-stam te vinden, die beter aan de te stellen eischen voldeed.

De gebruikte Aspergillus niger-stammen

Behalve de oorspronkelijke stam, door NIKLAS en medewerkers bij hun onderzoekingen gebruikt en welwillend ter onzer beschikking gesteld, hebben wij een *Aspergillus*-stam bij het onderzoek betrokken, die zich door sommige eigenschappen van den genoemden stam gunstig onderscheidde. Deze stam was door ons op de gebruikelijke wijze van krenten geïsoleerd en onderscheidde zich, doordat zij zich ook zonder toevoeging van pepton goed ontwikkelde, als stikstofbron ureum kon gebruiken, terwijl de optimale pH omstreeks 3,5 bleek te zijn, hetwelk in verband met de buffering van de cultuurvloeistof met behulp van calciumcitraat een belangrijk voordeel was.

Daarnevens werd nog een aantal proeven aangezet met een *Aspergillus*-stam, welke Prof. BAYENS te Leuven zoo vriendelijk was ter onzer beschikking te stellen.

De verschillende *Aspergillus*-stammen werden geregeld eens per maand overgeënt en op moutagarplaten verder gekweekt. Aanvankelijk werd door ons de door TRISCHLER aangegeven voedingsoplossing gebruikt, welke als volgt is samengesteld:

Saccharose	10 %
Citroenzuur	1 %

¹⁾ H. NIKLAS, G. VILSMEYER, F. KOHL. Die Bestimmung der Phosphatbedürftigkeit des Bodens mittels *Asp. niger*. *Z. Pfl. Ern. D.* A 32 p. 69. 1933.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,6 %
P_2O_5 als $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0,075 %
K_2O als K_2SO_4	0,02 %
MgSO_4	0,03 %
Cu als CuSO_4	0,00015 %
Zn als ZnSO_4	0,0001 %
Fe als FeSO_4	0,0001 %

De pH van deze vloeistof was omstreeks 2,5; daar deze pH voor den groei van den door ons gebruikten stam Groningen niet optimaal is, werd, wanneer met dezen stam werd geënt, de pH door toevoeging van 0,2 % NaOH op 3,5 gebracht.

NIKLAS c.s. gebruiken bij hun onderzoekingen erlenmeyers van 75 cm³ met 30 cm³ vloeistof; het bleek ons echter, dat bij gebruik van erlenmeyers van 300 cm³ met 75 cm³ vloeistof de verhouding tusschen het myceliumoppervlak en het vloeistofvolume gunstiger was, terwijl tevens de oogst grooter en de fout der bepalingen onderling kleiner was.

Het enten der cultures

De voor de enting benoodigde sporen werden eveneens gekweekt in erlenmeyers van 300 cm³ met 75 cm³ cultuurvloeistof, welke voor dit doel slechts 0,002 % P_2O_5 bevatte. Bij hooger fosphaatgehalte krijgt men namelijk wel een dikker mycelium, doch de ontwikkeling der sporen wordt door een laag fosphaatgehalte in de hand gewerkt.

Na zes dagen cultiveeren bij 37° C werd de voedingsoplossing onder de myceliumlaag weggeschonken en het mycelium eenige keeren met gesteriliseerd gedestilleerd water gewasschen. Nadat het laatste waschwasser er onderuit geschonken is, wordt het mycelium geschud met 50 cm³ gesteriliseerd, gedestilleerd water, waardoor een sporensuspensie ontstaat, die door een steriel nichroom-gaasje gefiltreerd wordt. Om te voorkomen, dat de enting van verschillende proeven ongelijk wordt, worden steeds eenige van deze suspensies samengevoegd.

Wat betreft de hoeveelheid sporenmateriaal, welke voor een goede enting noodig is, was reeds door SMITH, BROWN en MILLAR¹⁾ gevonden, dat de hoeveelheid gevormd mycelium toenam, naarmate meer sporen voor het enten gebruikt waren.

Dat dit inderdaad het geval is, blijkt uit nevengaannde proef, waarbij

¹⁾ F. R. SMITH, P. E. BROWN en A. C. MILLAR. *Journ. Am. Soc. Agronomy* 27, 988, 1935. The assimilation of phosphorus by *Aspergillus niger* and *Cunninghamella* Sp.

stijgende hoeveelheden sporen materiaal van den stam Groningen aan de oorspronkelijke cultuurvloeistof met 0,006 % P_2O_5 waren toegevoegd.

Toegevoegde entsuspensie	Myceliumgewicht na 6 dagen
0,1 cm ³	0,944 g
0,5 „	1,081 „
1,0 „	1,191 „

Het is dus noodzakelijk om telkens met dezelfde hoeveelheid sporen te enten; bij onze proeven is aanvankelijk met 3 druppels geënt, alzoo iets meer dan 0,1 cm³. Op den duur bleek echter, dat in sommige gevallen dit toch niet voldoende was om een snelle gelijkmatige ontwikkeling van het mycelium te waarborgen, weshalve bij onze laatste series proeven 0,5 cm³ entmateriaal werd gebruikt.

Tijdens het enten van grotere reeksen moet de sporensuspensie telkens geschud worden.

In plaats van enten met een sporensuspensie, kan ook worden geënt op de manier, zooals door NIKLAS wordt gedaan, nl. met droge sporen. Men gebruikt dan een mengsel van droge sporen met steriel talkpoeder. Dit mengsel wordt met behulp van een drogestofspuit op de voedingsoplossing in de cultuurkolven gespoten, waardoor op het vloeistofoppervlak een zeer dunne laag van het mengsel komt.

De cultuurtijd

Voor bepalingen voor de praktijk is het wenschelijk, dat de cultuurtijd zoo kort mogelijk is, terwijl tevens de verschillen in de myceliumgewichten bij verschillende concentraties P_2O_5 zoo geprononceerd mogelijk moeten zijn. Om dit na te gaan was het noodig om bij enkele verschillende P_2O_5 -concentraties het verband tusschen myceliumgewicht en cultuurtijd te bepalen. De myceliumgewichten werden bij twee concentraties P_2O_5 en wel 0,002 % en 0,008 %, na 2, 3, 4, 5, 6 en 7 dagen waargenomen, terwijl tevens de pH-veranderingen van de voedingsoplossing werden bepaald.

TABEL I

P_2O_5 in %	Myceliumgewicht in grammen						pH na				
	2 dagen	3 dagen	4 dagen	5 dagen	6 dagen	7 dagen	0 dagen	4 dagen	5 dagen	6 dagen	7 dagen
0,002	0,22	0,30	0,38	0,38	0,38	0,37	3,47	2,84	2,89	2,94	2,90
0,008	0,62	0,98	1,18	1,39	1,48	1,50	3,41	2,25	2,11	1,93	1,92

Stam Groningen. Temperatuur 37° C. De myceliumgewichten zijn het gemiddelde van drie bepalingen.

De pH van de oplossing werd bepaald met de chinhydronelectrode. We zien dus, dat na 5 dagen de groei vrijwel tot stilstand komt; met het oog op de wenschelijkheid, dat de proef zoo kort mogelijk duurt, werd met een groei-periode van 4 dagen volstaan. Het is echter wel noodzakelijk, dat de cultures *precies* na 4×24 uur afgebroken worden. Met deze proef is verder ook duidelijk, dat de verandering van de pH niet alleen afhangt van den duur van de proef, maar tevens, dat de pH sterker daalt, naarmate meer P_2O_5 aanwezig is. Dit wordt veroorzaakt, doordat de schimmel meer zuur maakt naarmate meer voedingsstoffen aanwezig zijn, wat tengevolge heeft, dat de gevonden uitkomst geen rechtstreeksche functie meer is van de hoeveelheid fosphaat. Het komt dus hierop neer, dat men bij stijgende P_2O_5 -concentraties met stijgende hoeveelheden zuur extraheert, waardoor een onderlinge vergelijking van de verkregen resultaten ten zeerste bemoeilijkt wordt.

Het afwerken van de geoogste mycelia vond als volgt plaats: na het beëindigen van den cultuurtijd werd aan de kolfjes een kleine hoeveelheid formaline toegevoegd, waarna ze eenigen tijd blijven staan. Hierdoor wordt het mycelium gelooid en het laat zich gemakkelijker hanteeren zonder te breken; ook worden de sporen gedood, waardoor infecties van het laboratorium voorkomen worden. Hierna wordt het mycelium met een pincet uit het kolfje gehaald, aan de achterzijde afgespoeld met gedestilleerd water en in een gewogen filter gebracht, waarna nog eenige keeren met warm water wordt gewasschen. Het mycelium met het filter wordt dan in een gewogen schaalkje gebracht, waarna $\pm 14-16$ uur wordt gedroogd bij $55^\circ C$, daarna nog twee uren bij $105^\circ C$.

De draaiing van het polarisatievlak van de voedingsoplossing als maatstaf voor den groei van de Aspergillus

Het leek niet uitgesloten, dat het mogelijk zou zijn om de bepalingen sneller te doen verlopen door het uitwasschen, drogen en wegen der mycelia te vervangen door een eenvoudige polarimetrische bepaling van de in de voedingsoplossing overgebleven suiker.

Rietsuiker is echter voor dit doel niet geschikt, daar de draaiing van een rietsuikeroplossing niet alleen zou veranderen door de biochemische omzettingen ten gevolge van den groei van de schimmel, maar tevens doordat het door de schimmel afgescheiden enzyme, de saccharose, de overgebleven rietsuiker zou splitsen in glucose en fructose, die een andere soortelijke draaiing hebben.

Aangezien de groei van de schimmel vrijwel evengoed is met glucose als met saccharose, werd de saccharose eenvoudig door glucose vervangen.

De cultuurtijd bedroeg eveneens 4 dagen; na afloop werd de oplossing van het mycelium afgegoten en afgecentrifugeerd.

De polarisatie van de oplossingen, waarop de *Aspergillus* gegroeid is, levert geen moeilijkheden, slechts in enkele gevallen was de oplossing zóó donker gekleurd, dat zij door schudden met een weinig norit ontkleurd moest worden. De polarisatie geschiedde met een eenvoudigen polarimeter van LAURENT, de aflezing met natrium-licht in schaaldeelen van LAURENT (1 normale booggraad = 4,642 schaaldeelen van LAURENT.) Lengte der buizen 20 cm.

Allereerst werd in zuivere cultuuroplossing nagegaan, welk verband er eventueel bestond tusschen de toegevoegde hoeveelheid P_2O_5 , de vermindering van de draaiing en het mycelgewicht. De resultaten na 4 dagen cultiveeren bij 37° C zijn in onderstaande tabel en nevengaande krommen vereenigd.

TABEL II

% P_2O_5 in de cultuurvloeistof	Afgelezen draaiing in graden Laurent	Myceliumgewicht in grammen
0, niet geënt	45,6	0,00
0, wel geënt	44,9	0,00
0,0025	26,2	0,36
0,005	17,8	0,72
0,0075	17,5	1,10
0,01	11,4	1,33
0,015	9,3	2,01
0,02	4,9	2,32
0,025	3,6	2,38

Zooals te verwachten neemt de draaiing af, naarmate de vloeistof meer fosphaat bevat en de schimmel meer mycelium produceert.

Kromme nr. I geeft het verband tusschen P_2O_5 -gehalte en myceliumgewicht weer, kromme nr. II tusschen P_2O_5 -gehalte en afgelezen draaiing, terwijl kromme n°. III uit n°. II en n°. I geconstrueerd werd en het verband tusschen de draaiingsvermindering en het myceliumgewicht aangeeft.

Bij vergelijking van de krommen I en II blijkt, dat de nauwkeurigheid van de polarimetrische methode bij de mycelgewichtsbepaling ten achter staat; de fouten zijn echter niet zoo groot, dat hierdoor de bepaling voor practische doeleinden te onnauwkeurig zou worden.

Opmerkelijk is, dat de snelheid waarmee de draaiing afneemt het grootst is bij de laagste P_2O_5 -concentraties; klaarblijkelijk gebruikt de schimmel voor den opbouw van de eerste hoeveelheden mycelium meer suiker dan voor den verderen groei, terwijl wellicht ook de ademhaling geringer is. Tevens zien wij, dat om en nabij het maximum (kromme n°. III) de verhouding mycelium-aanwas suikerafname weer kleiner wordt. Dit wordt waarschijnlijk

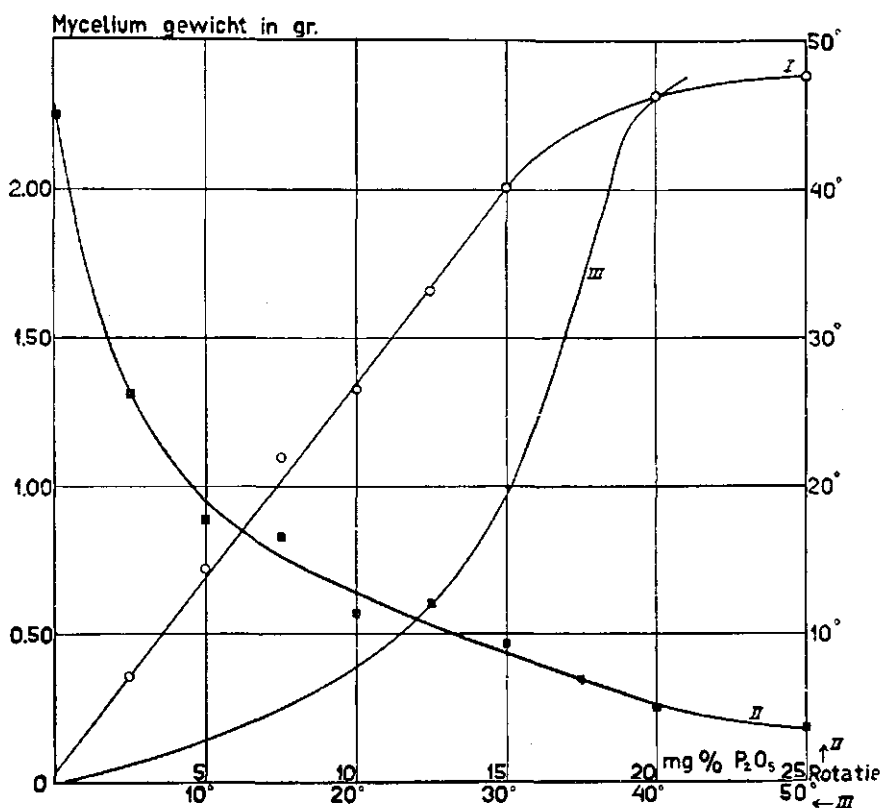


Fig. I

Polarimetrische suikerbepaling ter vervanging van de myceliumgewichtsbepaling, in zuivere voedingsoplossing met stijgende hoeveelheden fosfaat.

- I. Het verband tusschen myceliumgewicht en fosfaatgehalte van de voedingsvloeistof.
- II. Het verband tusschen rotatie van de gebruikte voedingsvloeistof en het fosfaatgehalte.
- III. Het verband tusschen de rotatie-vermindering en het myceliumgewicht, uit de krommen I en II afgeleid.

veroorzaakt, doordat het bij de hoogste P_2O_5 -concentraties gevormde dikke mycelium tevens een sterke ademhaling vertoont, waarbij dus suiker verdwijnt zonder dat dit in mycelium wordt omgezet.

De resultaten waren van dien aard, dat het wenschelijk leek ook enkele proeven met grond aan te zetten. De inrichting van deze proeven was zooals bij de fosfaatbepaling beschreven, behoudens de vervanging van saccharose door glucose. Bij deze proeven werd naast de polarisatie tevens het myceliumgewicht bepaald, zoodat een vergelijking der beide methoden mogelijk was.

TABEL III

Grond Nr.	Myc. gew. gr.	Rotatie	P ₂ O ₅ uit Myc. gew.	P ₂ O ₅ uit rotatie
Blanco	0,00	46,6	0	0
1	0,44	42,7	23	± 2
2	0,42	38,8	22	5
3	1,40	18,8	104	51
4	1,65	17,3	124	60
5	2,00	18,0	152	55

Het is duidelijk, dat de langs polarimetrischen weg gevonden cijfers geen behoorlijke overeenkomst vertoonen met de getallen, die uit de mycelium-gewichten berekend worden. Daar de proef slechts bedoeld was ter orienteering en het hierbij blijkt, dat er behalve het P₂O₅-gehalte ook andere factoren zijn, die de resulterende draaiïng bepalen, werd van verder onderzoek in deze richting afgezien.

De bepaling langs polarimetrischen weg van de door de schimmel verbruikte suiker is zonder meer bij het practisch bodemonderzoek niet toe te passen.

Wijzigingen in de samenstelling van de voedingsoplossing

De invloed van pepton

In het algemeen maakt de toevoeging van pepton aan een cultuurvloeistof deze gemakkelijker toegankelijk voor infecties, dan wanneer een anorganische verbinding als stikstofbron gebruikt wordt. Weliswaar wordt dit gevaar door de lage pH van $\pm 2,5$, waarbij NIKLAS werkt, belangrijk verminderd, het is echter bij de pH van 3,5, die tenslotte bij onze proeven als de meest wenschelijke werd bevonden, niet denkbeeldig. Bij massaonderzoek speelt ook het feit, dat pepton betrekkelijk duur is, ongetwijfeld een rol.

Het is dan ook als een voordeel te beschouwen, dat de door ons geïsoleerde stam Groningen geen pepton noodig heeft om goede mycelia voort te brengen; merkwaardig is, dat de groei zelfs positief door de aanwezigheid van pepton geschaad wordt.

In de hiernevengende tabel zien wij het resultaat van een orienteerende proef op dit punt.

Uit deze proef blijkt dus al dadelijk, dat vooral bij lage P₂O₅-concentratie de nadeelige invloed van pepton groot is. De groei van *Aspergillus* blijft in de eerste vier dagen bij aanwezigheid van pepton sterk terug, na dien tijd is de groei waarschijnlijk even goed als zonder pepton. Ook bij toevoeging van grond

TABEL IV

P_2O_5	Myceliumgewicht in gram	
	met 0,1 % pepton	zonder pepton
0,007 %	0,65	1,05
0,01 %	1,14	1,30
0,075 %	2,73	2,91
4,8 g grond	0,78	0,91

Gebruikt werd pepton Witte; cultuurtijd 6 dagen bij 37° C. Geënt met 2 ösen sporen van een plaat. Het myceliumgewicht is het gemiddelde gewicht per kolfje van 3 bepalingen.

als fosphaatbron blijft de groei in de oplossing met pepton achter bij die zonder pepton. Uit de tabel blijkt ook wel, dat de mycelia bij hooge P_2O_5 -concentratie zeer zwaar en dus dik zijn. De voedingsoplossing is dan ook vrijwel geheel doorgroeid met het mycelium.

Om de invloed van pepton nog beter na te gaan, werd een iets uitgebreider proef aangezet met stijgende hoeveelheden P_2O_5 .

TABEL V

P_2O_5	Myceelgewicht in grammen	
	zonder pepton	met pepton
0,0 %	0,009	0,007
0,001 %	0,143	0,089
0,002 %	0,303	0,234
0,004 %	0,644	0,501
0,006 %	0,840	0,657
0,008 %	1,018	0,809
0,010 %	1,338	0,987

Cultuurtijd 6 dagen bij 37° C. Stam Groningen. Deze proef was aangezet met 4 contrôle-proeven, geënt met 3 druppels entsuspensie. De gegeven myceelgewichten zijn dus de gemiddelde gewichten van 4 bepalingen.

Uit deze tabel blijkt dus wel duidelijk, dat de groei van den *Aspergillus*-stam Groningen bij alle P_2O_5 -concentraties beter is zonder pepton. Bij de volgende proeven met den stam Groningen werd altijd gebruik gemaakt van de oplossing zonder pepton.

De invloed van Fe, Cu, Zn en Mn-zouten op den groei van verschillende Aspergillus-stammen

Door TRISCHLER werd in zijn voedingsoplossing gebruikt: 0,00015 % Cu; 0,0001 % Fe en 0,0001 % Zn als de sulfaten. Door in plaats van 0,0001 % Fe

en 0,0001 % Zn, 0,0005 % Fe en 0,0005 % Zn toe te voegen, werd bij toevoeging van 0,006 % P_2O_5 aan de oplossing een myceelvermeerdering gekregen van 0,80 g tot 0,97 g, wat er op wijst, dat de opgegeven hoeveelheden voor onzen *Aspergillus*-stam niet optimaal waren. Ook de toevoeging van Cu werd verder nagegaan. Zie hiervoor de volgende tabel VI.

TABEL VI

P_2O_5	Myceelgewicht bij gebruik van Cu in %			
	0	0,00005	0,0001	0,0002
0,002 %	0,40	0,38	0,38	0,39
0,006 %	1,39	1,37	1,34	1,27
0,010 %	1,78	2,05	2,02	2,05

Cultuurtijd 6 dagen bij 37° C. Stam Groningen.

Uit tabel VI blijkt dat Cu slechts een geringen invloed heeft bij lage P_2O_5 -concentratie ; bij 0,010 % P_2O_5 echter is de invloed van het Cu duidelijk merkbaar. In het vervolg werd daarom aan de voedingsoplossing 0,00005 % Cu toegevoegd.

Tijdens het onderzoek ontstonden er moeilijkheden met den groei van *Aspergillus*-stam POSCHENRIEDER, wanneer deze gekweekt werd op de door TRISCHLER aangegeven voedingsoplossing. Ook werden geen bevredigende resultaten verkregen met den door Prof. BAEYENS ter beschikking gestelden stam *Aspergillus niger* „pseudo-citricus”, wanneer deze gekweekt werd op dezelfde voedingsoplossing. Wanneer er echter aan de culturen een weinig grond of grondextract werd, toegevoegd (een grond met zeer laag P_2O_5 -getal was voldoende) dan werd de groei uitstekend. Volgens SMITH ¹⁾ berust deze slechte groei op mangaangebrek. Toevoeging van slechts 0,0001 % Mn als $MnSO_4$ aan de voedingsoplossing van TRISCHLER had inderdaad tengevolge, dat de groei van *Aspergillus* Poschenrieder weer normaal werd.

TABEL VII

Stam	Myceelgewicht in grammen			
	handels-suiker		omgekristalliseerde suiker	
	O	Mn	O	Mn
Poschenrieder.	1,24	1,85	1,19	1,81
Baeyens	1,12	1,23	1,25	1,53

Per kolffe toegevoegd 0,01 % P_2O_5 . Cultuurtijd 4 dagen bij 37° C.

¹⁾ A. M. SMITH, *J. of the Soc. of Chem. Ind.* 55 217 (1936).

Toevoeging van 0,0001 % Mn geeft een belangrijken invloed op den groei van de stammen Poschenrieder en Baeyens. Zonder Mn vormen deze stammen geen samenhangende myceellagen, maar zijn onsamenhangend en draadvormig. Na toevoeging van Mn zijn de mycelia weer vast en geheel met sporen bedekt.

Het ontstaan van deze moeilijkheid in den groei tijdens het onderzoek moet waarschijnlijk worden toegeschreven aan de groote zuiverheid van de gebruikte chemicaliën. Op de door ons gebruikte voedingsoplossing van den stam Groningen is de groei van beide stammen uitstekend, zoodat deze chemicaliën waarschijnlijk voldoende Mn bevatten.

TABEL VIII

K ₂ O in %	Myceliumgewicht	
	O	Mn
0,004	1,49	1,33
0,012	2,45	2,38
7,5 g grond B II	2,03	2,05

Stam Groningen. Cultuurtijd 4 dagen bij 37° C. Gewijzigde voedingsoplossing, waaraan toegevoegd 0,075 % P₂O₅ als (NH₄)H₂PO₄ en verder verschillende hoeveelheden K₂O en ook een grond als K₂O-bron.

Uit deze proef blijkt wel, dat Mn geen invloed heeft op den groei bij gebruik van den stam Groningen met de gewijzigde voedingsoplossing. Hieruit valt dus ook te constateeren, dat de nog te vermelden vermeerderde groei met humuszuur niet te wijten is aan het in den grond aanwezige mangaan.

De *Aspergillus*-stammen van POSCHENRIEDER en BAEYENS groeien ook zonder toevoeging van Mn uitstekend op de voedingsoplossing van den stam Groningen. Doordat deze invloed van het Mn eerst tijdens het onderzoek naar voren kwam, kon in een aantal gevallen daarmede nog geen rekening gehouden worden.

De factoren welke de pH-veranderingen in het cultuurmedium beïnvloeden

Het is om de reeds eerder vermelde redenen voor het bepalen van het fosfaatgehalte in gronden met behulp van de *Aspergillus*-methode wenschelijk, dat de begin- en eind-pH van de voedingsoplossing zooveel mogelijk aan elkaar gelijk zijn.

De factoren, die de pH-veranderingen in de cultuurvloestof tijdens den groei van de schimmel beheerschen zijn de volgende:

1°. Het als N-bron gebruikte *ammoniumsulfaat*; naarmate de schimmel

beter groeit en meer ammoniak opneemt, blijft meer zwavelzuur over. Dit is ongetwijfeld de belangrijkste oorzaak voor het zuurder worden van het cultuurmedium.

2°. Voor de sulfaten van K, Mg en Ca geldt hetzelfde, zij het ook in mindere mate.

3°. De door de schimmel uit de suiker gevormde organische zuren, in de eerste plaats citroenzuur, doch daarnaast ook oxaalzuur, gluconzuur e.d.

4°. De buffercapaciteit van het cultuurmedium; deze is een resultante van het bufferend vermogen van de zuivere cultuurvloeistoffen en van den toegevoegden grond. Het bufferend vermogen van de cultuurvloeistof is slechts gering, dat van den grond hangt af van het humus- en CaCO_3 -gehalte. Aangezien het CaCO_3 met citroenzuur is geneutraliseerd, moet men hiervoor dus het Ca-citraat verantwoordelijk stellen.

Aangezien bij verschillende gronden het gehalte aan deze bestanddeelen zeer uiteen kan lopen, spreekt het vanzelf dat het bufferend vermogen van het cultuurmedium bij deze wijze van werken een zeer onzekere factor is.

5°. De hoeveelheid fosphaat, welke in den toegevoegden grond beschikbaar is. Naarmate de schimmel beter groeit, komen de onder 1, 2 en 3 genoemde factoren sterker tot uiting. Remmend werkt hier het feit, dat naarmate de vloeistof zuurder wordt, de schimmel slechter groeit.

Zooals duidelijk uit de volgende cijfers, die aan het onderzoek van NIKLAS, POSCHENBIEDER en TRISCHLER ontleend zijn, blijkt, hangt de eind-pH ten nauwste samen met de hoeveelheid assimileerbaar fosphaat.

TABEL IX

	Eind-pH na 4 dagen
Voedingsoplossing ongeënt	2,5
met 0,0025 % P_2O_5	1,99
0,005 % P_2O_5	1,69
0,0075 % P_2O_5	1,45
0,010 % P_2O_5	1,38
0,050 % P_2O_5	1,29

Door toevoeging van grond kon de aanvangs-pH soms tot 3,0 à 3,5 stijgen, waardoor het pH-traject nog weer werd verlengd.

Bij de chemische bepaling zien wij het volgende effect van een verlaging van de pH door toename van de hoeveelheid citroenzuur ¹⁾.

¹⁾ Beide tabellen ontleend aan: NIKLAS, VILSMEIER en F. KOHL, blz. 53 en 55.

TABEL X

Grond-nummer	pH 2,54, 0,25 % citr.z.	pH 1,92, 4,0 % citr.z.	meer in %
25	4,4 mg P ₂ O ₅ in 100 g grond	6,9 mg P ₂ O ₅ in 100 g grond	+ 56,7
16	6,8	11,4	68,0
7	8,8	13,3	51,2
15	21,9	29,6	35,2
4	15,2	71,9	367,0
12	70,0	138,4	97,7

De bepalingen met de *Aspergillus* bij verschillende pH's geven al even sterk uiteenlopende cijfers (mycelium-gew. in g na 5 d).

TABEL XI

Grond Grond Nr.	pH 2,73	pH 2,25	pH 2,03
25	0,678	0,846	1,120
7	0,561	1,105	2,012
15	1,644	2,183	2,726
4	0,901	1,949	3,738
23	2,618	3,082	4,066(pH 1,99)

Niettegenstaande alzoo uit de door NIKLAS en medewerkers zelf verkregen gegevens duidelijk blijkt, welk een grooten invloed de pH op de hoeveelheden phosphor heeft, die men hetzij chemisch of microbiologisch bepaalt, is dit blijkbaar geen reden geweest om hun in 1930 ingenomen standpunt aangaande dit probleem te wijzigen. Hierover zeggen zij: ¹⁾ „Um die Methode nicht unnötig zu komplizieren, lässt man am besten den Anspruch auf gleiche End-pH fallen”.

Dat NIKLAS c.s. het bufferend vermogen van de cultuurvloeistof niet naar behooren hebben kunnen regelen komt o.i. in hoofdzaak, doordat zij hebben vastgehouden aan een begin pH van 2,5.

Deze pH is ten eerste niet optimaal voor de *Aspergillus niger*, terwijl door het Ca-citraat, dat ontstaat bij de neutralisatie van het in de gronden aanwezige CaCO₃ met citroenzuur de pH vaak weer tot omstreeks 3,5 stijgt. Deze pH is voor de *Aspergillus* wel optimaal en bovendien is de vloeistof bij aanwezigheid van Ca-citraat in de vloeistof bij een pH van $\pm 3,5$ het sterkst gebufferd.

¹⁾ Die Ernährung der Pflanze. Bd. 26. blz. 102. 1930.

Het behoeft geen verder betoog, dat waar het mogelijk is zulke enorm verschillende uitkomsten te verkrijgen al naar gelang van de pH, de methode voor *phosphaatbepalingen* volkomen onbruikbaar is, tenzij men er in slaagt deze foutenbron te elimineeren.

De invloed van de stikstofbron op de pH-veranderingen

Voor het veranderen van de voedingsoplossing komt in de eerste plaats de vervanging van het ammoniumsulfaat in aanmerking, omdat dit in een concentratie van 0,6 % in de voedingsoplossing voorkomt.

De vervanging van MgSO_4 en K_2SO_4 , die slechts in concentraties van enkele honderdste procenten in de voedingsoplossing aanwezig zijn, is van minder belang.

Voor de stikstofbron werd een keuze gemaakt uit een serie N-bronnen, die door BRENNER¹ onderzocht zijn in verband met de synthese van eiwitten; hij ging na in hoeverre verschillende an-organische en organische stikstofverbindingen door *Aspergillus niger* worden benut.

De nu volgende proeven werden allereerst verricht met den door NIKLAS gebruikten en ons ter beschikking gestelden stam *Aspergillus niger* van POSCHENRIEDER, die overgeënt werd op den door NIKLAS aangegeven zuren voedingsbodem. Deze *Aspergillus*-stam is aangepast aan een begin-pH van ongeveer 2,5.

Genomen werd als stikstofbron: ²⁾

- I. 0,6 % ammoniumsulfaat;
- II. ammoniumcitraat; (hoeveelheid N, aequivalent met 0,6 %
- III. ammoniumacetaat; amm. sulfaat)
- IV. ammoniumlactaat;
- V. asparagine;
- VI. ureum;
- VII. 0,3 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + $1\frac{1}{2}$ g ureum;
- VIII. ammoniumcitraat + ureum;

¹⁾ W. BRENNER, Die Stickstoff-Nahrung der Schimmelpilze. *C. f. Bakt.* XL 555 (1914).

²⁾ Het zou voor de hand gelegen hebben, om de zwavelzure ammoniak in de eerste plaats te vervangen door ammoniumnitraat, dat algemeen als een physiologisch neutrale voedingsstof bekend is. Volgens onderzoekingen van SCHLOESING, BUTKEWITSH, NIKITINSKY e.a. prefereert echter de *Aspergillus* in dat geval toch de ammoniakstikstof, terwijl door BRENNER (l.c.p. 601) is aangetoond, dat de oplossing sterk zuur wordt ten gevolge van het overgebleven salpeterzuur. Uit het toegevoegde ammonium-nitraat werd bijna 90 % van de daarin aanwezige ammoniakstikstof geassimileerd, terwijl van de toegevoegde nitraatstikstof ongeveer 80 % overbleef en als vrij HNO_3 in de vloeistof aantoonbaar was.

IX. asparagine + ammoniumsulfaat;

X. asparagine + ammoniumcitraat.

De voedingsoplossing I is de oorspronkelijke en bevat 6 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ per l.

In de voedingsoplossing II is het ammoniumsulfaat vervangen door amm.-citraat. Deze amm.-citraat-oplossing is gemaakt door samenvoegen van 500 cm³ citroenzuur van 2,15 N en 500 cm³ ammoniak van 2,15 N. Dit mengsel heeft een pH 7. Aan 1 l van de gewone voedingsoplossing werd 90 cm³ van deze oplossing gevoegd. Het N-gehalte van deze oplossing komt dan overeen met 0,6 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. De zuurgraad van deze oplossing wordt door dissociatie van de amm. citraatoplossing hoger, nl. 4,5. Om de groei van *Aspergillus* beter te kunnen vergelijken met de amm. sulfaatoplossing werd aan 1 l voedingsoplossing extra toegevoegd 15 g citroenzuur, de pH daalt tot 3,2.

De oplossing III bevat per liter 12 g ammonium-acetaat. Ook hier treedt weer dissociatie op, daarom werd nog toegevoegd 15 g citroenzuur per l, Ph 3,5. Het N-gehalte van alle oplossingen komt overeen met 0,6 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

De oplossing IV bevat 9,8 g ammoniumlactaat per l (pH = 3,5).

De oplossing V bevat 6 g asparagine, de oplossing VI 3 g ureum, de oplossing VIII bevat 45 cm³ van de bij II gebruikte ammoniumcitraatoplossing + 1,5 g ureum, IX bevat 4 g asparagine + 2 g ammoniumsulfaat en X 4 g asparagine + 30 cm³ van de bij II gebruikte oplossing van ammoniumcitraat.

Bij gebruik van ammoniumsulfaat, dus bij oplossing I, heeft het mycelium in de kolven met 0,01 % P_2O_5 geen sporen gevormd. Bij ammoniumcitraat, oplossing II, is het oppervlak bij alle concentraties met sporen bedekt. Uit tabel XII blijkt wel duidelijk, dat de groei op de voedingsoplossingen I en II ongeveer gelijk is, de verandering van de pH van de oplossing is bij gebruik van ammoniumcitraat duidelijk kleiner dan bij gebruik van $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Bij de ammoniumsulfaatoplossing ontstaat deze pH-verandering door twee factoren nl.:

1°. het door den groei van de *Aspergillus* uit het ammoniumsulfaat vrijkomende (en ook uit MgSO_4 , K_2SO_4 enz.) H_2SO_4 ;

2°. de door den groei van *Aspergillus* uit de suiker ontstane organische zuren.

Bij oplossing II, de ammoniumcitraatoplossing, is de toestand iets anders. Hier treden de volgende factoren op:

1°. de door den groei van *Aspergillus* uit de suiker ontstane organische zuren.

2°. het door het gebruik van stikstof uit het ammoniumcitraat vrijkomende citroenzuur.

3°. door het verbruik van stikstof uit de voedingsoplossing zal er in de

voedingsoplossing minder ammonium-citraat overblijven, waardoor het bufferend vermogen van de voedingsoplossing achteruit gaat.

Bij vervanging van het ammoniumsulfaat door de aequivalente hoeveelheid ammoniumacetaat (opl. III) en ammoniumlactaat (opl. IV) in de voedingsoplossing vormde *Aspergillus* slechts een spoor mycelium. Hier werkt het door het toegevoegde citroenzuur vrijwordende ongedissocieerde azijn- en melkzuur giftig. Bij toevoeging van geringe hoeveelheden azijn- en melkzuur aan de voedingsoplossing met $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ werd ook slechts een spoor mycelium gevormd.

TABEL XII

De invloed van de stikstofbron op mycelopbrengst en pH

	0,002 % P_2O_5			0,006 % P_2O_5		
	Myc. gew. in g	Begin- pH	Eind- pH	Myc. gew. in g	Begin- pH	Eind- pH
I. Amm. sulfaat	0,31	2,29	1,98	1,01	2,29	1,56
II. Amm. citraat	0,33	3,24	2,81	0,95	3,17	2,58
III. Amm. acetaat	0,00	3,50	—	—	3,50	—
IV. Amm. lactaat	0,00	3,50	—	—	—	—
V. Asparagine	0,24	2,39	2,51	—	—	—
VI. Ureum	0,21	2,19	2,91	—	—	—
VII. Amm. sulf. + ureum .	0,16	2,41	2,55	0,68	2,43	2,32
VIII. Amm. citr. + ureum .	0,15	3,34	3,45	0,74	3,47	3,09
IX. Amm. sulf. + asparagine	0,32	2,55	2,42	0,74	2,53	2,37
X. Amm. citr. + asparagine	0,30	3,18	2,76	0,84	3,18	2,63

	0,008 % P_2O_5			0,010 % P_2O_5		
	Myc. gew. in g	Begin- pH	Eind- pH	Myc. gew. in g	Begin- pH	Eind- pH
I. Amm. sulfaat	—	—	—	1,37	2,29	1,32
II. Amm. citraat	—	—	—	1,45	3,17	2,30
III. Amm. acetaat	0,00	3,50	—	—	—	—
IV. Amm. lactaat	0,00	3,50	—	—	—	—
V. Asparagine	1,13	2,39	2,79	—	—	—
VI. Ureum	0,86	2,19	2,81	—	—	—
VII. Amm. sulf. + ureum .	—	—	—	1,10	2,43	2,12
VIII. Amm. citr. + ureum .	—	—	—	1,13	3,47	2,81
IX. Amm. sulf. + asparagine	—	—	—	1,17	2,53	2,06
X. Amm. citr. + asparagine	—	—	—	1,28	3,15	2,50

(Stam Poschenrieder.)

Bij de oplossingen V en VI (asparagine en ureum) is het mycelium geheel met sporen bedekt. Het myceelgewicht is bij ureum laag, bij asparagine betrekkelijk goed. De pH van deze oplossingen stijgt tijdens den groei. Deze stijging wordt waarschijnlijk veroorzaakt door enzymatische splitsing van asparagine en ureum, waardoor er NH_3 in de oplossing komt.

Hoe is de groei en de verandering van den zuurgraad bij de citraat-ureum (opl. VII) en sulfaat-ureum-mengsels (opl. VIII)? Hier zou men kunnen verwachten, dat de pH constant blijft, omdat bij gebruik van ureum de pH stijgt, terwijl de pH bij ammonium-citraat en ammoniumsulfaat daalt. Het bleek echter, dat er ook hier in beide gevallen een pH-daling optrad. Deze pH-daling is echter beduidend kleiner dan bij gebruik van ammonium-sulfaat en citraat alleen. Maar hiertegenover staat ook weer, dat bij de oplossingen VII en VIII de myceelgewichten lager zijn.

Bij de oplossingen IX (sulfaat-asparagine) en X (citraat-asparagine) zou men ook kunnen verwachten, dat de pH constant blijft. Ook dit blijkt niet het geval te zijn. Wel is de pH-verandering veel kleiner geworden, maar bedraagt bij de concentratie 0,01 P_2O_5 bij het mengsel citraat-asparagine toch nog 0,65. De groei is bij alle concentraties lager dan bij gebruik van ammonium-sulfaat en ammoniumcitraat alleen. Bij gebruik van de oplossingen IX en X is het mycelium bij alle concentraties met sporen bedekt.

Over het algemeen is de groei van de *Aspergillus*-stam Poschenrieder het beste op de oorspronkelijke ammoniumsulfaat-oplossing, zoodat vervanging door een andere N-bron niet beantwoordt aan de voorwaarde, dat de oplossing een optimalen groei van de schimmel moet geven.

Omdat er met de stam *Aspergillus niger* van Poschenrieder geen voedings-oplossing verkregen werd, waarbij de begin- en eind-pH van de voedings-oplossing aan elkaar gelijk waren en waarbij tevens de groei van *Aspergillus* optimaal was, werden er nog verschillende pogingen gedaan om met den stam *Aspergillus niger* Groningen betere resultaten te verkrijgen. Het was n.l. gebleken dat deze stam, wat betreft de zuurvorming uit de N-bron, geheel andere resultaten gaf dan de stam Poschenrieder ¹⁾. Zoo blijkt bij gebruik van ureum de pH tijdens den groei te stijgen bij den stam Poschenrieder, terwijl deze bij den stam Groningen iets daalt.

Als N-bron werden de volgende stikstofverbindingen aan de voedings-oplossing toegevoegd:

¹⁾ Voor den stam Groningen is een pH van 3,5 optimaal, weshalve aan de oorspronkelijke cultuurvloeistof 0,2 % NaOH werd toegevoegd. In die gevallen, waarin het noodig was de stam Groningen bij een aanvangs-pH van 2,5 te doen groeien, werd gebruik gemaakt van een zijtak van dezen stam, die door herhaald overenten eenigermate aan een zuurder omgeving was aangepast.

- I. 4 g ureum p. l;
 II. 4 g. ureum + 1 gr asparagine p. l;
 III. 6 g asparagine p. l;
 IV. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ p. l.

De gebruikte voedingsoplossing bevat bovendien per liter:

10 % saccharose.	0,00005 % Cu	} als sulfaten
1 % citroenzuur	0,0005 % Fe	
0,03 % MgSO_4	0,0002 % Zn	
0,02 % K_2O als K_2SO_4	0,2 % NaOH	

benevens stijgende hoeveelheden $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

TABEL XIIIa

P_2O_5 in %	Myceliumgewicht in g per kolfje							
	Ureum I		Ureum + asparagine II		Asparagine III		$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ IV	
		gem.		gem.		gem.		gem.
0,002	0,40	0,39	0,38	0,42	0,41	0,39	0,45	0,40
	0,42		0,41		0,39		0,35	
	0,36		0,49		—		0,39	
0,006	1,07	1,07	0,97	0,97	1,01	1,02	1,19	1,17
	1,06		0,94		1,03		1,18	
	1,07		1,00		—		1,13	
0,01	1,35	1,42	1,18	1,23	1,63	1,50	1,68	1,58
	1,44		1,29		1,36		1,65	
	1,48		—		—		1,41	

TABEL XIIIb

P_2O_5 in %	Ureum I		Ureum + asparagine II		Asparagine III		$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	
	begin-pH	eind-pH	begin-pH	eind-pH	begin-pH	eind-pH	begin-pH	eind-pH
0,002	3,41	2,89	3,62	3,05	3,59	2,86	3,57	2,88
0,006	3,43	3,00	3,62	3,02	3,61	2,72	3,62	2,24
0,010	3,41	2,65	3,64	2,77	3,61	2,43	3,62	1,84

Stam Groningen. Geënt met 3 druppels entsuspensie. De cultuurtijd was bij deze proef iets korter dan 4 dagen.

Het bleek, dat na 4 dagen alle mycelia met sporen bedekt waren, ook die bij de concentratie van 0,01 % P_2O_5 . De myceelgewichten zijn op de 4 oplossingen

bij toevoeging van 0,002 % P_2O_5 ongeveer gelijk, de pH-dalingen zijn hier in de volgorde I-IV; 0,52; 0,59; 0,73 en 0,69.

De pH-daling is dus bij gelijken groei op de ureumoplossing het kleinste. Bij de P_2O_5 -concentratie van 0,006 % P_2O_5 zijn de myceelgewichten resp. 1,07; 0,97; 1,02 en 1,17 gr terwijl de pH-dalingen resp. 0,43; 0,60; 0,89 en 1,38 zijn. Hier treedt dus al een aanmerkelijk verschil in de pH-daling bij de verschillende voedingsoplossingen op, terwijl ook hier de ureumoplossing de kleinste pH-daling geeft. Bij de fosphaatconcentratie van 0,01 % zijn de myceelgewichten resp. 1,42 g, 1,23 g, 1,50 g en 1,58 g en de pH-dalingen 0,76; 0,87 1,18 en 1,78. Op de ureumoplossing is de myceelontwikkeling iets kleiner dan op de ammoniumsulfaatoplossing. Het verschil in pH-daling is echter veel grooter. Worden deze resultaten vergeleken met die van tabel X, waar de *Aspergillus*stam van Poschenrieder werd gebruikt, dan blijkt onmiddellijk dat deze twee stammen geheel verschillend op de verschillende stikstofvoeding reageeren. Bij gebruik van ureum was de groei van *Aspergillus* Poschenrieder vrij slecht, terwijl de pH steeg; bij den stam Groningen is de groei bijna even goed als op de ammoniumsulfaatoplossing, terwijl de pH maar betrekkelijk weinig daalt. Ook bij gebruik van asparagine als stikstofbron treden verschillen op: terwijl de pH bij gebruik van den stam Groningen vrij sterk daalt, stijgt deze bij gebruik van den stam Poschenrieder.

Waardoor daalt nu de pH van de voedingsoplossing bij gebruik van ureum als stikstofbron? Deze daling wordt waarschijnlijk veroorzaakt door het tijdens den groei van de schimmel uit het Mg- en K_2SO_4 vrijkomende H_2SO_4 en gedeeltelijk door de door de schimmel gevormde organische zuren.

Door de *Aspergillus* wordt het enzym urease gevormd, waardoor ureum in ammoniak en CO_2 uiteenvalt. Wanneer men nu per l voedingsvloeistof een grootere hoeveelheid ureum toevoegt, zou het kunnen gebeuren, dat door de urease een grootere hoeveelheid ammoniak in de oplossing komt, zoodat het nog gevormde H_2SO_4 en de organische zuren geneutraliseerd worden, waardoor een pH-daling tijdens den groei geheel of gedeeltelijk zou worden opgeheven.

Hierover werd het volgende proefje gedaan. Toegevoegd werden per l 4, 5, 6 en 8 g ureum.

Uit tabel XIVa blijkt dus, dat bij toevoeging van meer ureum aan de voedingsoplossing de myceelopbrengst, vooral bij de concentratie van 0,01 % P_2O_5 , terug gaat. Dat deze teruggang in myceliumopbrengst vrij belangrijk is blijkt, wanneer men de opbrengst bij de oplossingen met 4 en 8 g ureum bij dezen fosphaatconcentratie vergelijkt. Het myceelgewicht is bij de 1e oplossing 1,51 g per kolfje en bij de 2e 1,21 g, dat is dus een vermindering van 0,30 g of 20 % van de totaalopbrengst. De pH-veranderingen zijn bij deze

TABEL XIVa

P ₂ O ₅ in %	Myceelgewicht in g							
	4 g ureum		5 g ureum		6 g ureum		8 g ureum	
0,006	0,96	0,98	0,92	0,95	0,90	0,91	0,85	0,88
	1,03		1,00		0,88		0,88	
	0,94		0,94		0,94		0,90	
0,01	1,46	1,51	1,34	1,38	1,30	1,35	1,23	1,21
	1,51		1,37		1,40		1,13	
	1,55		1,43		—		1,28	

TABEL XIVb

P ₂ O ₅ in %	4 g ureum		5 g ureum		6 g ureum		8 g ureum	
	Begin-pH	Eind-pH	Begin-pH	Eind-pH	Begin-pH	Eind-pH	Begin-pH	Eind-pH
0,006	3,52	3,05	3,62	3,15	3,50	3,21	3,48	3,22
0,01	3,48	2,84	3,58	2,91	3,48	3,03	3,47	3,12

Geënt met 3 druppels entsuspensie. Stam Groningen. Cultuurtijd 4 dagen bij 37° C.

oplossingen 0,64 en 0,35. De pH is dus minder gedaald dan de myceel-gewichts-vermindering zou doen verwachten; bij gebruik van de voedingsoplossing met 8 g ureum wordt dus inderdaad, zooals ook al verondersteld was, door de urease meer ammoniak uit ureum vrij gemaakt.

Het is echter niet wenschelijk om met de voedingsoplossing, die 8 g ureum bevat, de proeven voort te zetten, omdat deze oplossing niet meer voldoet aan den eisch van optimale voedingsoplossing. Besloten werd daarom om het onderzoek voort te zetten met de voedingsoplossing met 4 g ureum als N-bron.

Daar het dus niet gelukte om door toevoeging van meer ureum aan de voedingsoplossing de pH tijdens den groei geheel constant te houden, terwijl de groei van de *Aspergillus* goed blijft, werd op een andere manier getracht de pH-verandering tijdens den groei zoo klein mogelijk te maken. Wat gebeurt er nl. wanneer men voorkomt, dat tijdens den groei H₂SO₄ gevormd wordt uit het gebruikte kalium- en Mg-sulfaat? Er werd daarom een proefje aangezet waarbij deze sulfaten vervangen waren door de overeenkomstige citraten. Hierbij bleek, dat de groei bij toevoeging van 0,002 % P₂O₅ normaal was, maar dat de groei bij gebruik van 0,006 en 0,01 % P₂O₅ ver beneden de normale opbrengst bleef. Doordat op deze wijze aan de vloeistof het element zwavel onthouden was, werd vermoed, dat deze geringe groei veroorzaakt werd door

gebrek aan zwavel. Het was dus noodzakelijk dit na de gaan door aan de kolfjes een andere zwavelbron toe te voegen.

Bij het nu volgende proefje werd als zwavelbron genomen: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (natriumthiosulfaat) in concentratie van 0,1 en 0,2 %, verder thioureum in concentratie 0,1 %, CaSO_4 in concentratie 0,1 en 0,5 % en bloem van zwavel in concentratie van 0,05 %.

TABEL XIV c.

Toegevoegde S-bron	Myceel-gewicht	Begin-pH	Eind-pH
Zonder S	0,36	3,67	3,43
0,1 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0,33	4,63	3,99
0,2 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0,22	4,81	4,52
0,1 % thioureum	1,07	3,86	3,18
0,1 % CaSO_4	1,49	3,69	3,10
0,5 % CaSO_4	1,72	3,64	2,76
0,05 % S	0,79	3,67	3,60

Stam Groningen. Cultuurtijd 4 dagen bij 37° C. Aan alle kolfjes toegevoegd 0,01 % P_2O_5 . Geënt met 3 druppels entsuspensie; de myceelgewichten zijn het gemiddelde van 3 parallelbepalingen.

Uit tabel XIV c blijkt wel duidelijk, dat natriumthiosulfaat een nadeeligen invloed op den groei heeft, want bij stijgende concentratie van het $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ daalt het myceelgewicht.

Bij toevoeging van thioureum krijgt men een matigen groei van de schimmel. Bij gebruik van thioureum bleek uit verdere proeven, dat de pH-meting onbetrouwbaar was, thioureum werkt nl. op chinchhydron in, zoodat er nooit een constante pH gemeten kan worden. Bij gebruik van bloem van zwavel als S-bron is de myceelopbrengst ongeveer het dubbele als wanneer er geen S in de voedingsoplossing is. Zwavel wordt in dezen vorm dus wel opgenomen, maar toch is de groei hierop nog veel te laag. De pH-daling tijdens den groei is hier wel erg klein nl. maar 0,07, hetgeen er dus op wijst, dat ook de S-bron bij deze daling betrokken is.

Tenslotte blijft als S-brondus nog over CaSO_4 . Bij de concentratie 0,1 % CaSO_4 is de myceelopbrengst gelijk aan die in tabel XIV a, terwijl ook de daling van de pH tijdens den groei vrijwel even groot is als die in tabel XIV b. Gaat men nu de hoeveelheid CaSO_4 vergrooten tot 0,5 %, dan stijgt het myceelgewicht tot 1,72, terwijl de pH-daling weer groter wordt nl. 0,88. Men zou hier kunnen verwachten, dat het tijdens den groei tengevolge van het verbruik van S uit het CaSO_4 vrijkomende Ca neutraliseerend zou werken. Dit is echter niet het geval. Door de schimmel wordt meer Ca opgenomen dan S, zoodat er in de oplossing

een overmaat SO_4 -ionen ontstaat. Door deze meerdere Ca-opname wordt ook de myceelgewichtsvermeerdering verklaard. De mycelia zijn bij de proeven met CaSO_4 geheel met sporen bedekt, zijn stevig en gemakkelijk uit de kolven te krijgen.

Ook het CaSO_4 is dus niet geschikt om als S-bron te gebruiken. Daarom werd besloten om in plaats van K- en Mg-citraat in het vervolg maar weer K en Mg-sulfaat aan de oplossing toe te voegen. De toevoeging van Ca aan de voedingsoplossing zal nog behandeld worden.

De invloed van Ca-zouten op den groei van Aspergillus niger

Door WEHMER¹⁾ was al in 1891 aangetoond, dat Ca een belangrijken invloed uitoefent op den groei van *Aspergillus*.

Ook BUROWSKY²⁾, BENECKE³⁾ en MOLISCH⁴⁾ schrijven aan Ca bij aanwezigheid van Mg een gunstigen invloed toe op de vorming van het mycelium. Ook is deze kwestie uitvoerig onderzocht door NIKLAS⁵⁾,⁶⁾, POSCHENRIEDER, TRISCHLER en VILSMEIER⁷⁾. TRISCHLER⁸⁾ vond, dat door toevoeging van Ca-zouten aan de voedingsoplossing de zuurgraad van de voedingsoplossing veranderde, zoodat deze zich bewoog in de richting van de optimale pH (Deze is $\pm 3,5$). Volgens NIKLAS, POSCHENRIEDER en VILSMEIER is het noodzakelijk om voor de bepaling van kalium in kalkhoudende gronden rekening te houden met de, zich in den grond bevindende, hoeveelheid calcium. Op welke wijze dit calciumgehalte in rekening gebracht zou moeten worden, wordt niet aangegeven.

Hoe is nu de invloed van Ca op den stam *Aspergillus niger* Groningen? Hierover het volgende orienteerende proefje: Aan de voedingsoplossing, die bevat 10 % saccharose, 1 % citroenzuur, 0,06 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,02 % K_2O , 0,03 % MgSO_4 , 0,2 % NaOH en 0,00005 % Cu, 0,0005 % Fe, 0,0002 % Zn als de sulfaten werden bij verschillende P_2O_5 -concentraties stijgende hoeveelheden CaCO_3 gevoegd.

¹⁾ WEHMER, *Bot. Ztg.* **49** (1891).

²⁾ BUROWSKY, *Jhr. ber. Fortschr. Agr. Chem.* **15**, 175 (1912).

³⁾ BENECKE, *Zbl. Bakter.* II Ref. **3**, 675 (1897).

⁴⁾ MOLISCH, *Akad. Wiss. Math. natura kl.* **103** I (1894).

⁵⁾ NIKLAS, POSCHENRIEDER en TRISCHLER, *Z. f. Pfl. Ern. Düngung und Bodenk.* **12**, 109 (1933).

⁶⁾ NIKLAS, VILSMEIER, POSCHENRIEDER, *Z. f. Pfl. Ern. D. und Bodenk.* **A 24**, H 3/4 167 (1932).

⁷⁾ VILSMEIER, Diss. München (1931).

⁸⁾ TRISCHLER, Diss. München (1930).

TABEL XV

De invloed van stijgende hoeveelheden Ca op mycelgewicht en pH

P_2O_5 in %	$CaCO_3$ in grammen	Begin pH	Eind-pH	Myc. gewicht in grammen
0,002	0,00	3,53	2,95	0,33
	0,25	4,62	3,15	0,33
	0,50	6,13	6,52	geen myc. vorming
	0,75	7,26	8,40	geen myc. vorming
0,006	0,00	3,58	2,64	1,03
	0,25	4,68	3,22	0,92
	0,50	—	7,80	geen myc. vorming
	0,75	7,76	8,20	geen myc. vorming
0,01	0,00	3,53	1,65	1,66
	0,25	4,72	2,68	1,86
	0,50	7,62	3,19	1,65
	0,75	7,60	7,45	geen myc. vorming

De myceliumgewichten zijn het gemiddelde van drie bepalingen. Cultuurtijd 4 dagen bij 37° C, stam Groningen. Geënt met drie druppels entsuspensie.

Toevoeging van $CaCO_3$ heeft bij de hoeveelheden van 0,5 en 0,75 g per kolfje ten gevolge, dat de *Aspergillus* niet meer groeit, omdat de pH van de voedingsoplossing te hoog is geworden. Bij toevoeging van 0,25 g $CaCO_3$ aan de voedingsoplossing met 0,01 % P_2O_5 treedt wel een mycelium-gewichts-vermeerdering op.

Het is voor het bepalen van den invloed van Ca op den groei dus beter om een andere Ca-bron te nemen. Gekozen werden $CaSO_4$ en Ca-citraat, waarvan per kolfje werden toegevoegd 0,4 en 1,25 g. Bij toevoeging van Ca-citraat aan de zure voedingsoplossing van TRISCHLER, dus met pH 2,5, stijgt de pH door den bufferenden invloed van Ca-citraat tot $\pm 3,5$. Dat is tevens de optimale pH voor de schimmel. Daarom werd aan deze oplossingen geen NaOH toegevoegd, maar wel aan de kolfjes zonder Ca en met $CaSO_4$.

Uit tabel XVI blijkt, dat de invloed van Ca op het myceliumgewicht zoowel bij gebruik van $CaSO_4$ als bij Ca-citraat groot is.

TABEL XVI

Toegevoegd Ca-zout	Myc. gewicht	Begin-pH	Eind-pH
Geen toevoeging	1,56	3,49	1,85
0,4 g $CaSO_4$	1,85	3,45	1,80
1,25 g $CaSO_4$	1,97	3,54	1,94
0,4 g Ca-citr	1,89	3,31	1,98
1,25 g Ca-citr	2,02	3,38	2,84

Cultuurtijd 4 dagen bij 37° C. Stam Groningen. Geënt met 2 ösen van een plaat. Aan alle kolfjes toegevoegd 0,01 % P_2O_5 .

Bij gebruik van 1,25 g Ca-citraat per kolfje stijgt het myceliumgewicht aanmerkelijk, terwijl de pH-daling kleiner is en slechts 0,54 bedraagt. De vraag is nu, hoe is de invloed van Ca-citraat op de gewijzigde voedingsoplossing, waarin dus $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ door ureum is vervangen. De pH-daling was hierin volgens tabel XIIIb bij toevoeging van 0,01 % $\text{P}_2\text{O}_5 = 0,64$. De bedoeling van de volgende proef is om na te gaan:

1. Hoe verandert de pH van de voedingsoplossing?
2. Is de groei van *Aspergillus* op deze oplossing goed, heeft de schimmel dus voldoende aan de als K_2SO_4 en MgSO_4 toegevoegde S?
3. Is de pH-verandering en de groei van *Aspergillus* nog verschillend, wanneer men verschillende hoeveelheden Ca-citraat toevoegt?

TABEL XVII

Ca-citraat per kolfje	Myc. gew.	Begin-pH	Eind-pH
0,75 g	1,71	3,40	3,19
1,25 g	2,07	3,49	3,12
1,50 g	2,12	3,49	3,12

Cultuurtijd 4 dagen, bij 37° C. Stam Groningen. Geënt met 2 ösen van een plaat. Per kolfje 0,01 % P_2O_5 . Aan de bij deze proef gebruikte voedingsoplossing was geen NaOH toegevoegd.

Uit tabel XVII is dus duidelijk te zien, dat de *Aspergillus* voldoende heeft aan de als K_2SO_4 en MgSO_4 toegevoegde S. De myceelopbrengsten zijn hier uitstekend. Het myceliumgewicht stijgt bij toevoeging van meer Ca-citraat, maar het blijkt toch wel, dat bij gebruik van 1,25 Ca-citraat per kolfje het myceelgewicht ongeveer maximaal is. Ook de pH-verandering wordt niet meer kleiner bij gebruik van meer Ca-citraat. Wanneer er per kolfje 1,25 g Ca-citraat wordt toegevoegd, is de pH-daling gereduceerd tot 0,37. Deze pH-daling is nu dus vrij klein gebleven en in ieder geval ten opzichte van de oorspronkelijke voedingsoplossing van TRISCHLER aanmerkelijk verbeterd. Bij de bepalingen van fosphaat in gronden wordt in het vervolg bij gebruik van den stam Groningen 1,25 g Ca-citraat per kolfje toegevoegd.

De invloed van de groeistof Rhizopine en van humuszuur op den groei van Aspergillus niger

Door N. NIELSEN ¹⁾ en later ook in samenwerking met S. HARTELIUS ²⁾ was aangetoond, dat de door hen uit de schimmel *Rhizopus suinus* geïsoleerde groeistof rhizopine, een stimulerenden invloed uitoefent op den groei van

¹⁾ C. R. Carlsberg 19 5 (1931), Centr. Bl. f. Bakt. II. 82 70 (1931).

²⁾ N. NIELSEN en S. HARTELIUS. C. R. Carlsberg 21 8 (1933).

Aspergillus niger. Door NIELSEN werd echter een voedingsoplossing gebruikt, die een vrij lage myceliumopbrengst geeft. De vraag rees nu op of bij de bepaling van fosphaat in den grond misschien ook dergelijke groeistoffen een invloed op de myceelopbrengst kunnen uitoefenen, temeer daar gebleken was, dat een kleine hoeveelheid grond toegevoegd aan de voedingsoplossing, soms een groote myceelgewichtsvermeerdering gaf. Ook door KIESZLING ¹⁾ was aangetoond, dat toevoeging van huminezuur en ook van andere organische stoffen den groei van *Aspergillus* bevorderde. Iets dergelijks was ook gevonden door BURKS, LONEWAEVER en KENNETH HORNER ¹⁾ in verband met de stimulerende werking van humuszuur bij aanwezigheid van Fe op den groei van *Azotobacter Vinelandie*.

1°. De Rhizopine-oplossing werd bereid volgens het voorschrift van NIELSEN. *Rhizopus suinus* (stam NIELSEN) werd gekweekt op een voedingsoplossing, die per liter bevatte: 10 g ammoniumtartraat, 10 g glucose, 0,5 g KH_2PO_4 en verder een weinig Fe, Cu en Zn. Van deze oplossing werden telkens 200 cm³ in 11 kolven 15 minuten bij $\frac{1}{2}$ atm. gesteriliseerd en daarna geënt met *Rhizopus*. Na 5 dagen cultiveeren bij 37° C. werd de oplossing gefiltreerd, waarna 15 minuten bij $\frac{1}{2}$ atm. werd gesteriliseerd. Dit is de oorspronkelijke rhizopine-oplossing van NIELSEN (opl. I).

In deze Rhizopine-oplossing bevinden zich volgens NIELSEN twee groeistoffen, die hij Rhizopine a en b noemt, hiervan is er één in aether oplosbaar.

2°. 500 cm³ van oplossing I werden met aether geëxtraheerd, de aetherische oplossing werd gedroogd met Na_2SO_4 , waarna de aether afgedestilleerd werd. Het residu is een geelbruine olieachtige massa, die niet geheel in water oplost. Deze waterige oplossing werd aangevuld tot 50 cm³ (opl. II).

3°. Volgens NIELSEN is de oorspronkelijke Rhizopine-oplossing te zuiveren door deze te behandelen met alcohol: 100 cm³ van deze oplossing werden behandeld met de tweevoudige hoeveelheid alcohol. Er ontstaat dan in de oplossing een neerslag. Dit neerslag werd afgefiltreerd, de alcohol uit het filtraat afgedestilleerd en tenslotte de laatste rest alcohol op een waterbad verdreven. De overblijvende vloeistof werd met H_2O aangevuld tot 100 cm³ (opl. III).

Eerst werd de invloed nagegaan, die oplossing II heeft op den groei van *Aspergillus niger*, stam Poschenrieder. Toegevoegde hoeveelheden oplossing II per kolfje van 0—2 cm³ bij de fosphaatconcentraties 0,002 %; 0,006 % en 0,008 %.

TABEL XVIII

P_2O_5 in %	Myceliumgewicht bij toevoeging van Rhizopine in cm ³				
	0,0	0,25	0,5	1,0	2,0
0,002	0,24	—	0,25	0,24	—
0,006	0,58	0,61	0,66	0,56	0,49
0,008	0,92	—	1,07	0,90	—

Cultuurtijd 3 dagen bij 37° C. Gebruikt werd de voedingsoplossing volgens TRISCHLER.

¹⁾ KIESZLING. *Die Ernährung der Pflanze* 28 324 (1932).

²⁾ BURK, LONEWAEVER en KENNETH HORNER, *Soil science* 32 413 (1932).

Het myceliumgewicht is het gemiddelde van 3 bepalingen.

Toevoeging van 0,5 cm³ Rhizopine-oplossing II heeft een geringe stijging van het myceelgewicht ten gevolge; wordt er meer rhizopine-oplossing toegevoegd, dan daalt het myceelgewicht echter. Over het algemeen is de groei van den stam Poschenrieder hier niet goed, de mycelia vormen geen samenhangende lagen, maar zijn meer draadvormig. Dit verschijnsel werd ook bij verdere proeven waargenomen en bleek op mangaangebrek te berusten, waarover reeds bericht.

Daarom werd de invloed van de verschillende Rhizopine-oplossingen nog eens op den groei van den stam Groningen nagegaan. De proef werd na drie dagen afgebroken, omdat volgens NIELSEN de invloed van rhizopine na drie dagen het grootste is.

TABEL XIX

Toegevoegde Rhizopine-oplossing	Myceliumgewicht
Contrôle, zonder toevoeging	1,09
1 cm ³ oplossing I	1,23
5 cm ³ oplossing I	1,31
10 cm ³ oplossing I	1,25
1 cm ³ oplossing II	1,00
1 cm ³ oplossing III	0,96
5 cm ³ oplossing III	0,85

Per kolfje toegevoegd 0,008 % P₂O₅. Cultuurtijd 3 dagen bij 37° C. Bij deze proef werd nog gebruik gemaakt van de voedingsoplossing met (NH₄)₂SO₄, die met 0,2 % NaOH op pH 3,5 was gebracht. De myceliumgewichten in tabel XIX zijn het gemiddelde van drie parallelbepalingen. Stam Groningen.

Uit deze proef blijkt, dat oplossing I, de oorspronkelijke Rhizopine-oplossing van NIELSEN, den grootsten invloed op de myceliumopbrengsten heeft. De myceliumopbrengst stijgt nog bij toevoeging van 5 cm³ Rhicopine-oplossing, maar daarna treedt er weer een daling in. Deze opbrengstvermeerdering is bij toevoeging van 5 cm³ oplossing I ongeveer 20 %. De vraag is of deze meerdere myceliumopbrengst niet ook ten deele moet worden toegeschreven aan het fosphaat, dat de Rhizopine-oplossing nog bevat. Wanneer men 10 cm³ van oplossing I per kolfje toevoegt, bevat dit, wanneer men aanneemt, dat er tijdens den groei van *Rhizopus* *suinus* geen fosphaat uit de voedingsoplossing is verdwenen, (dit is natuurlijk niet juist) 0,0035 % P₂O₅. Dus toevoeging van 1 cm³ zou de fosphaatconcentratie van de voedingsoplossing van *Aspergillus* op zijn hoogst kunnen verhoogen met 0,00035 %, waardoor deze dus komt op 0,00835 %. Deze verhooging van de P₂O₅-concentratie kan slechts een zeer geringe myceliumgewichtsvermeerdering geven. Dit komt

ook uitstekend overeen met een ander proefje, waarbij aan de voedingsoplossing voor den stam Groningen als fosphaatbron uitsluitend 1 cm³ Rhizopine-oplossing was toegevoegd. Er wordt dan een myceliumopbrengst van 0,05 g gevonden. ¹⁾

De meerdere groei tengevolge van de toevoeging van 1 cm³ Rhizopine bedraagt 148 mg, waarvan dus hoogstens 50 mg op rekening van het extra toegevoegde fosphaat kan komen. Toevoeging van oplossing II aan de kolfjes, dus de aetherextractie, geeft in dit geval, in tegenstelling met het in tabel 19b gevondene, een vermindering van de myceliumopbrengst. De volgens NIELSEN gezuiverde Rhizopine-oplossing III geeft eveneens een lagere myceliumopbrengst. De vraag is, welken invloed de Rhizopine-oplossing en humuszuur, op de gewijzigde voedingsoplossing uitoefenen. Deze gewijzigde voedingsoplossing bevat nu:

10	% saccharose,
1	% citroenzuur,
0,4	% ureum,
0,02	% K ₂ O als K ₂ SO ₄ ,
0,03	% MgSO ₄ ,
0,00005	% Cu als CuSO ₄ ,
0,0005	% Fe als FeSO ₄ ,
0,0002	% Zn als ZnSO ₄ .

Verder P₂O₅ als (NH₄)H₂PO₄ en per kolfje 1,25 g Ca-citraat. De begin-pH van deze voedingsoplossing is \pm 3,5. Ook hier werd weer de invloed van deze stimulerende stoffen nagegaan na drie dagen cultuurtijd. Toegevoegd werden de oorspronkelijke Rhizopine-oplossing, verder huminezuur van MERCK en een op het laboratorium uit turf bereid humuszuur. Zoowel de oplossing van huminezuur Merck, als het humuszuur uit turf, werden voor het toevoegen aan de culturen met NaOH geneutraliseerd.

TABEL XXa

Toegevoegde stof	Mycelium-gewicht
Voedingsoplossing zonder toevoeging	1,17
12,5 mg humusz. (M.)	1,25
12,5 mg humusz. (turf)	1,38
1 cm ³ Rhizopine	1,40

Cultuurtijd 3 dagen bij 37° C. Stam Groningen. Geënt met 2 ösen van een plaat. Toegevoegd per kolfje 0,01 % P₂O₅. Mycelgewicht is het gemiddelde van drie bepalingen.

¹⁾ Analyse van de Rhizopine-oplossing: 50 cm³ geeft 0,1995 gram molybdaat, dit is 0,0075 gram P₂O₅. Toevoeging van 1 cm³ per kolfje komt overeen met 0,0002 % P₂O₅.

Toevoeging van huminezuur Merck heeft slechts een geringe myceelgewichtstoename ten gevolge. Grooter is deze bij toevoeging van humuszuur uit turf bereid. Ook toevoeging van 1 cm³ Rhizopine is van invloed op de myceliumopbrengst. Bij analyse van de uit turf bereide humusoplossing bleek deze geen fosphaat te bevatten.

Een vervolg op deze proef is samengevat in de volgende tabel. Hier wordt de invloed van huminezuur Merck, humuszuur en Rhizopine nagegaan, na drie en vier dagen, terwijl tevens de pH-veranderingen gemeten werden.

TABEL XXb

Toegevoegde stof	Myc. gew. na 3 dagen		Myc. gew. na 4 dagen		Begin pH	pH na 3 dagen	pH na 4 dagen
Oorspronkelijke voedingsoplossing	0,99		1,35		4,17	3,56	3,37
1 cm ³ Rhizopine	1,08	+ 9,1%	1,60	+ 18,5%	4,18	3,58	3,38
12,5 mgr humuszuur	1,29	+ 30,5%	1,83	+ 35,6%	4,18	3,58	3,37
12,5 mgr Humuszuur (turf)	1,39	+ 40,4%	1,91	+ 41,5%	4,18	3,63	3,40
12,5 mgr Humuszuur + 1 cm ³ Rhizopine	1,36	+ 36,4%	1,94	+ 43,5%	4,18	3,59	3,40

De myceelgewichten zijn het gemiddelde van 4 bepalingen. Toegevoegd per kolfje 0,01 % P₂O₅. Geënt met 3 druppels suspensie. (Bij deze proef was bij vergissing aan de gewijzigde voedingsoplossing met pH 3,5 nog 0,2 % NaOH toegevoegd, waardoor de begin-pH steeg tot \pm 4,2).

Toevoeging van Rhizopine heeft ook hier weer, zoowel na 3 als na 4 dagen, een geringe myceelopbrengstvermeerdering ten gevolge. Grooter is deze echter, wanneer humuszuur Merck of humuszuur uit turf wordt toegevoegd, waarvan het laatste nog de hoogste myceelgewichten geeft. Als er bij de humuszuuroplossing nog extra Rhizopine-oplossing wordt gevoegd, is van de invloed van de Rhizopine-oplossing niet veel meer te merken. De veranderingen van de pH tijdens den groei zijn bij alle oplossingen gelijk.

Het is alzoo duidelijk, dat de toevoeging van humuszuur aan de zuivere voedingsoplossing de myceliumopbrengst met meer dan 40 % kan doen vermeerderen. Waar dit het geval blijkt, was het zeker ook wenschelijk om na te gaan of bij onderzoek van den grond op fosphaten de myceelgewichten al dan niet door humustoevoeging worden vergroot.

Hiertoe werden bij een achttal gronden van verschillenden aard en oorsprong de myceelgewichten bepaald met en zonder toevoeging van het humaat.

Het is duidelijk, dat ook bij gebruik van grond als fosphaatbron, de toevoeging van kleine hoeveelheden humaat, in de helft van het aantal onderzochte gevallen het myceliumgewicht heeft doen toenemen en wel met be-

TABEL XXI

Grondmonster	Myceelgewicht			Verschil door humus- toevoeging
	zonder humus	middelb. fout	met humus	
Zavelgrond, bemest met super	0,42	$\pm 0,02$	0,53	+ 26,2 %
Zandgrond, heide-ontginning	0,44	$\pm 0,02$	0,44	0,—
Idem, met zware phosph. bemesting	1,14	$\pm 0,03$	1,11	— 2,7 %
Zavelgrond, onbemest	0,54	+ 0,02	0,76	+ 40,7 %
Kleigrond	1,34	$\pm 0,07$	1,33	— 0,8 %
Kleigrond, bemest met super	0,66	$\pm 0,01$	0,73	+ 9,1 %
Duinzand	0,51	$\pm 0,03$	0,53	+ 4,0 %
Humushoudende klei	0,42	+ 0,02	0,58	+ 38,1 %

dragen, die varieren van 9,1 tot 40,7 %, welke duidelijk boven de middelbare fout liggen.

Dat er daarnaast gronden zijn, die op humaattoevoeging niet reageeren, is te verwachten; deze gronden bevatten de benodigde stof reeds van origine, zoodat verdere toevoeging geen effect heeft.

Alhoewel het wellicht wenschelijk ware, dit punt aan een grooter aantal monsters te onderzoeken, is met het bovenstaande toch met voldoende zekerheid aangetoond, dat het ook bij het practisch bodemonderzoek wenschelijk is door humaattoevoeging de voedingsvloeistof te completeeren, waarmede een oncontroleerbare bron van fouten definitief uitgeschakeld wordt.

II. Vergelijking van den groei en de pH-veranderingen van de stammen Groningen en Poschenrieder

Vergelijking van de met stijgende hoeveelheden P_2O_5 verkregen myceliumgewichten en de pH-veranderingen

Voor de phosphaatbepalingen met de stam Groningen werd gebruik gemaakt van de volgende voedingsoplossing. Deze bevat:

10	% saccharose,
1	% citroenzuur,
0,4	% ureum,
0,02	% K_2O als K_2SO_4 ,
0,03	% $MgSO_4$,
0,00005	% Cu als $CuSO_4$,
0,0005	% Fe als $FeSO_4$,
0,0002	% Zn als $ZnSO_4$,
0,0001	% Mn als $MnSO_4$.

Verder wordt toegevoegd per kolfje met 75 cm³ voedingsoplossing: 1,25 Ca-citraat en 12,5 mg humuszuur.

Voor het bepalen van de fosphaatkurve werden stijgende hoeveelheden P₂O₅ toegevoegd, in den vorm van (NH₄)H₂PO₄. Deze curve werd bepaald met telkens 4 parallelproeven. De cultuurtijd bedroeg 4 dagen, bij een temperatuur van 37° C. Voor deze bepalingen werd gebruik gemaakt van de reeds vroeger beschreven entsuspensie, waarvan per kolfje 3 druppels werden toegevoegd.

De mycelia blijken na 4 dagen alle met sporen bedekt te zijn, zelfs bij de concentratie van 0,04 % P₂O₅; ze zijn vast en samenhangend. Bij de kolfjes tot en met een P₂O₅-concentratie van 0,01 %, ligt na den groei nog Ca-citraat op den bodem, bij die van 0,012 tot 0,02 % is het grootendeels opgelost. Bij de concentratie 0,04 % echter ligt er weer een dik neerslag op den bodem. In tabel XXII zien we, dat wat betreft de stam Groningen, tot de concentratie 0,01 % P₂O₅ de begin- en eind-pH vrijwel aan elkaar gelijk zijn, bij de concentratie 0,012 % tot 0,02 % daalt de eind-pH iets door het in de oplossing gevormde zuur, waardoor het toegevoegde Ca-citraat in oplossing gaat. Bij de concentratie 0,04 % P₂O₅ treedt een ander geval op. Hier wordt door proteolyse van het mycelium weer ammoniak in oplossing gebracht, waardoor de pH stijgt tot ± 4 en het toegevoegde Ca-citraat neerslaat. De met den stam Groningen analoge curve van den stam Poschenrieder werd hierna bepaald. Als voedingsoplossing werd genomen de volgende:

10	% saccharose,
1	% citroenzuur,
0,6	% (NH ₄) ₂ SO ₄ ,
0,1	% pepton,
0,02	% K ₂ O als K ₂ SO ₄ ,
0,03	% MgSO ₄ ,
0,00005	% Cu als CuSO ₄ ,
0,0005	% Fe als FeSO ₄ ,
0,0002	% Zn als ZnSO ₄ ,
0,0001	% Mn als MnSO ₄ .

Ook van deze voedingsoplossing werd per kolfje 75 cm³ gebruikt. De bepalingen werden gedaan in 4 parallelproeven. De cultuurtijd was 4 dagen bij een temperatuur van 37° C. Ook hier werd geënt met drie druppels entsuspensie. Na den cultuurtijd van 4 dagen zijn de mycelia, tot en met de concentratie van 0,01 % P₂O₅, geheel met sporen bedekt, die van 0,012 tot en met 0,017 % gedeeltelijk en de hogere concentraties hebben geen sporen. De mycelia zijn vast en goed samenhangend.

Bezieet men de in tabel XXII gevonden pH-getallen dan blijkt, dat bij stijgende myceliumopbrengsten de pH-dalingen bij den stam Poschenrieder geregeld grooter worden. De grootste hier gevonden pH-daling is van 2,53 tot 1,49, dit is dus met 1,04. De grootste bij den stam Groningen gevonden pH-daling was van 3,53 tot 3,19, dit is dus 0,34. De pH-daling is dus bij gebruik van den stam Groningen en de definitieve oplossing veel kleiner dan die van den stam Poschenrieder met de voedingsoplossing van TRISCHLFR. Wanneer

TABEL XXII

P ₂ O ₅ in %	mg P ₂ O ₅ in 100 g grond	Stam Groningen			Stam Poschenrieder		
		Myc. gewicht	Begin- pH	Eind- pH	Myc. gewicht	Begin- pH	Eind- pH
0	0	0,005 ± 0,00	3,55	3,33	0,05 ± 0,00	2,53	2,53
0,001	10	0,21 ± 0,024	3,55	3,29	0,16 ± 0,036	2,53	2,53
0,002	20	0,39 ± 0,00	3,53	3,29	0,33 ± 0,021	2,53	2,39
0,003	30	0,58 ± 0,020	3,53	3,36	0,50 ± 0,013	2,53	2,27
0,004	40	0,82 ± 0,046	3,53	3,45	0,65 ± 0,012	2,53	2,15
0,005	50	0,96 ± 0,074	3,53	3,45	0,75 ± 0,023	2,53	2,04
0,006	60	1,15 ± 0,026	3,53	3,45	0,98 ± 0,032	2,53	1,84
0,007	70	1,29 ± 0,029	3,53	3,47	1,18 ± 0,071	2,53	1,68
0,008	80	1,52 ± 0,048	3,53	3,45	1,33 ± 0,038	2,53	1,58
0,009	90	1,61 ± 0,088	3,55	3,45	—	—	—
0,010	100	1,81 ± 0,048	3,53	3,45	1,72 ± 0,018	2,53	1,58
0,012	120	2,17 ± 0,016	3,53	3,29	2,04 ± 0,010	2,53	1,54
0,014	140	2,31 ± 0,069	3,53	3,19	2,12 ± 0,020	2,53	1,57
0,017	170	2,66 ± 0,062	3,53	3,19	2,39 ± 0,022	2,53	1,52
0,020	200	2,75 ± 0,069	3,53	3,24	2,51 ± 0,037	2,53	1,52
0,025	250	—	—	—	2,49 — 0,048	2,53	1,49
0,030	300	—	—	—	2,58 — 0,033	2,53	1,49
0,040	400	2,45 ± 0,073	3,53	4,00	—	—	—

de myceelopbrengsten worden vergeleken, dan blijkt de myceelopbrengst bij den stam Groningen bij alle concentraties grooter te zijn dan bij den stam Poschenrieder (Tabel XXII). Uit deze tabel zijn de krommen voor de fosphaatbepalingen in grond berekend. (Fig. 2).

Voor de fosphaatbepaling in grond werd per kolfje van 300 cm³, bevattend 75 cm³ cultuuroplossing, toegevoegd 7,5 g grond. Deze hoeveelheid van 7,5 g grond werd genomen om de gevonden P₂O₅-getallen te kunnen vergelijken met de in 1 % citroenzuur gevonden P₂O₅-getallen. Neemt men b.v. aan, dat per kolfje met 75 cm³ cultuurvloeistof aanwezig is 0,02 % P₂O₅, dan zou een grond, die hetzelfde myceelgewicht geeft in 7,5 g grond $0,02 \times \frac{75}{100} \text{ g} = 15$

mg P₂O₅ bevatten. Dit geeft voor de hoeveelheid P₂O₅ in 100 g grond $\frac{100}{7,5} \times 15 = 200 \text{ mg P}_2\text{O}_5$.

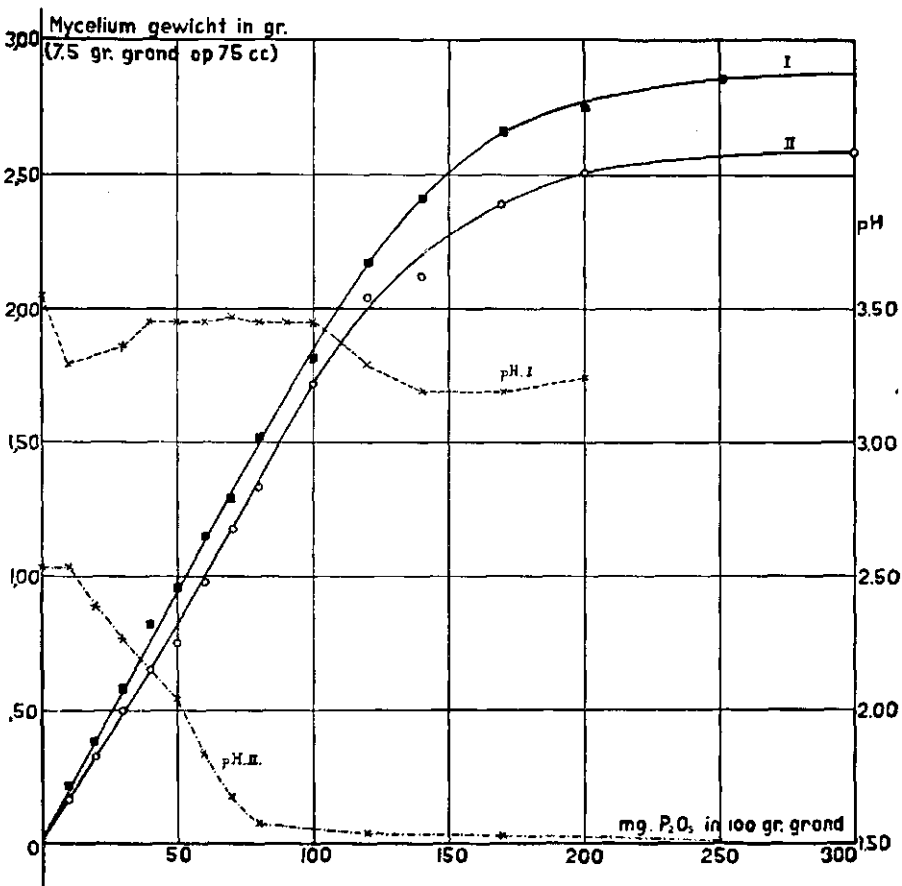


Fig. II

Het verband tusschen het myceliumgewicht van *Aspergillus niger* en de P_2O_5 -concentratie in het voedingsmedium

Aan de vloeistof werden stijgende hoeveelheden $NH_4H_2PO_4$ toegevoegd en de myceliumgewichten bepaald. De toegevoegde hoeveelheden P_2O_5 werden daarna op 100 g grond omgerekend.

Kurve I voor den nieuwen stam „Groningen”, kurve II voor den gebruikelijken stam Poschenrieder.

De gestippelde lijnen geven het verloop van de bijbehorende pH's aan; het is duidelijk, dat in de goed gebufferde nieuwe oplossing met den stam Groningen (I) de pH veel minder verandert dan in de oorspronkelijke voedingsoplossing van Niklas (II).

b. Met behulp van den stam Groningen werd in ± 70 grondmonsters het P_2O_5 -gehalte bepaald. Als grondmonsters werden gekozen verschillende grondtypen, zooals zand, humushoudende zandgrond, zavel- en kleigronden. Ook werd in eenige kalkhoudende gronden het P_2O_5 -gehalte bepaald. Bij

de bepalingen werden telkens 7,5 g luchtdroge grond per kolfje toegevoegd, terwijl de begin-pH bepaald werd in een extra kolfje.

Bij kalkhoudende gronden is het noodzakelijk, om de in den grond aanwezige kalk van tevoren met citroenzuur te neutraliseeren. De kalkbepaling in de grondmonsters werd gedaan volgens de methode van SCHEIBLER. De myceliumopbrengsten en de zuurgraad-veranderingen van de voedingsoplossing zijn samengevat in tabel XXIII, terwijl de beschrijving der grondmonsters te vinden is in tabel XXV. Uit tabel XXIII blijkt, dat de begin- en

TABEL XXIII

N ^o . Grond	Mycelium-gewicht	Begin-pH	Eind-pH	N ^o . grond	Mycelium-gewicht	Begin-pH	Eind-pH	N ^o . grond	Mycelium-gewicht	Begin-pH	Eind-pH
1)											
41567	0,09	3,41	3,41	39375	0,26	3,47	3,27	40442	0,38	3,40	3,47
41666	0,30	3,40	3,40	39374	0,41	3,41	3,32	56144	0,56	3,42	3,56
41662	0,91	3,41	3,41	59188	0,34	3,70	3,36	Eemsk. Tuing.	2,98	3,56	4,66
41673	0,21	3,40	3,40	59187	0,75	3,73	3,34	Hoogh. I	1,31	3,50	3,35
41671	1,53	3,41	3,33	50291	0,35	3,55	3,21	idem IV	0,72	3,50	3,26
41558	0	3,41	3,45	50290	0,52	3,57	3,29	id. VI	0,21	3,47	3,27
41559	0,10	3,41	3,41	45010	0,46	3,57	3,29	id. IX	0,14	3,47	3,26
41583	1,08	3,41	3,47	45028	0,78	3,59	3,36	id. X	0,55	3,47	3,26
41562	0,16	3,41	3,40	61873	0,86	3,52	3,29	id. 1,26	0,27	3,45	3,26
41586	1,25	3,41	3,40	61879	1,21	3,52	3,29	id. 3,22	0,30	3,41	3,36
41079	0,11	3,43	3,36	53861	1,24	3,52	3,34	id. 5,24	1,12	3,40	3,35
41082	0,28	3,43	3,35	53851	1,72	3,52	3,29	id. 8,33	0,22	3,45	3,47
41084	0,66	3,43	3,45	61366	1,15	3,48	3,29	id. 10,29	0,41	3,36	3,49
41719	0,82	3,43	3,41	61370	1,92	3,50	3,29	id. 12,31	0,61	3,32	3,47
41715	1,83	3,45	3,29	57123	1,51	3,55	3,36	pH veld B	0,28	3,43	3,32
41714	1,53	3,45	3,29	57153	2,57	3,59	3,17	pH veld H.	0,46	3,47	3,35
20697	0,92	3,45	3,43	30475	0,68	3,52	3,29	39363	0,38	3,62	3,38
20699	1,28	3,47	3,36	30473	1,78	3,57	3,31				
36197	2,50	3,47	3,26	44333	1,65	3,52	3,36				
36201	2,17	3,45	3,27	51489	0,24	3,52	3,31				
32309	1,33	3,56	3,40	51495	1,05	3,52	3,38				
32303	1,74	3,54	3,40	C.C.polder	1,29	3,74	3,74				
32249	3,02	3,54	3,27	44011	0,61	3,67	3,67				
32243	3,06	3,47	3,14	G.O. 75	1,22	3,81	3,81				
39362	0,50	3,62	3,32	50992	1,36	3,45	3,73				
20701	1,47	3,47	3,31	44329	1,09	3,52	3,36				

Stam Groningen. Cultuurtijd 4 dagen bij 37° C.

De in de tabel opgenomen mycelium-gewichten zijn het gemiddelde van 3 bepalingen.

Geënt met 3 druppels entsuspensie.

1) Nadere bijzonderheden over deze gronden, wat betreft herkomst, grondsoort en bemesting, vindt men in tabel XXV.

eind-pH van de verschillende bepalingen ongeveer gelijk zijn. Ook is door toevoeging van de gronden aan de voedingsoplossing de begin-pH slechts weinig veranderd. De laagste gemeten begin-pH is 3,40, terwijl de hoogste begin-pH 3,81 is. (Dit is bij den grond G.O. 75 met 4,5 % CaCO_3). Dit is dus een verschil in begin-pH van 0,41. De laagste gemeten eind-pH is 3,21, terwijl de hoogste 3,81 is. Hier bedraagt het verschil dus maximaal 0,60. *Het gemiddelde bedrag waarmee de pH is veranderd, bedraagt 0,15*: een uitzondering maakt de grond uit den proeftuin van het Proefstation aan het Eemskanaal, welke grond een abnormaal hoog fosphaatgehalte had van 419 mg (volgens LEMMERMANN) en waarbij de pH tot 4,66 was gestegen.

De groei van *Aspergillus niger* Groningen was over het algemeen uitstekend, terwijl er slechts in een enkel geval infectie met *Penicillium* optrad. In een twintigtal van deze gronden werd ook het P_2O_5 -gehalte bepaald met behulp van den stam Poschenrieder. Ook hier werden de kalkhoudende gronden geneutraliseerd met citroenzuur. Door de toevoeging aan de voedingsoplossing van de verschillende grondmonsters verandert de begin-pH vrij sterk. Was deze begin-pH bij de P_2O_5 -kurve steeds $\pm 2,5$, hier varieert de begin-pH van 2,39 tot 3,67; dus een verschil van 1,28, terwijl de eind-pH verschillen vertoont van 1,94 tot 3,28, dus een verschil van 1,34.

TABEL XXIV

N°. grond	Stam Groningen			Stam Poschenrieder		
	Mycelium-gewicht	Begin-pH	Eind-pH	Mycelium-gewicht	Begin-pH	Eind-pH
41719	0,83	3,43	3,41	0,70	2,84	2,69
41714	1,53	3,45	3,29	1,15	2,88	2,25
41715	1,83	3,45	3,29	1,30	2,98	2,23
41657	0,09	3,41	3,41	0,13	2,39	2,60
41673	0,21	3,40	3,40	0,50	2,62	2,53
41671	1,53	3,41	3,33	1,26	2,64	1,99
32249	3,02	3,54	3,27	2,05	2,77	2,06
32243	3,06	3,47	3,14	2,15	2,74	2,07
39363	0,38	3,62	3,38	0,48	3,03	2,88
39362	0,50	3,62	3,32	0,53	3,12	2,88
44011	0,61	3,67	3,67	0,48	3,36	3,03
G O 75	1,22	3,81	3,81	1,13	3,52	3,28
50992	1,36	3,45	3,73	1,25	2,67	2,13
56144	0,56	3,42	3,56	0,48	2,84	2,76
45010	0,46	3,57	3,29	0,50	2,96	2,63
45023	0,78	3,59	3,36	0,66	2,89	2,50
57133	1,61	3,55	3,36	1,11	2,79	2,21
57153	2,57	3,59	3,17	2,05	2,90	1,94
C.C.polder	1,29	3,74	3,74	1,24	3,67	3,24

Cultuurtijd 4 dagen bij 37° C. Myceelgewicht is het gemiddelde van 3 bepalingen. Geënt met 3 druppels entsuspensie.

Voor vergelijking van den groei en de zuurgraad-veranderingen tijdens den groei van de stammen Groningen en Poschenrieder worden in tabel XXIV de gevonden uitkomsten samengevat. Als de begin- en eind-pH veel verschillen, kan dit een belangrijke fout geven bij vergelijking van de myceelopbrengsten met de oorspronkelijke P_2O_5 -kromme. De omstandigheden, waaronder *Aspergillus* groeit zijn namelijk veranderd, zoodat het mogelijk is, dat er bij de berekening van de P_2O_5 -getallen in grond met behulp van de P_2O_5 -kurve fouten optreden. Uit tabel XXIII blijkt, dat dit niet het geval is bij den stam Groningen. Hier is de pH van de voedingsoplossing $\pm 3,5$, terwijl deze door toevoeging van grond, door de bufferende werking van het aanwezige Ca-citraat, slechts weinig verandert.

Opmerkelijk is verder, dat de myceliumgewichten van den stam Groningen in de meeste gevallen hooger zijn dan die van den stam POSCHENRIEDER. In tegenstelling met de verwachting zijn de myceliumgewichten van stam Poschenrieder in die gevallen, waarin de pH het meest gedaald is, *kleiner* dan de overeenkomstige waarden van den stam Groningen (N°. 41 671 met resp. 1,53 en 1,26 g en N°. 57 153 met resp. 2,57 en 2,05 g).

Het is buiten twijfel, dat er meer fosphaat in oplossing gaat naarmate het medium zuurder is; er moeten dus andere factoren zijn, die de ontwikkeling van den stam Poschenrieder in de slecht gebalanceerde cultuurvloestof hebben tegengehouden, waarbij in de eerste plaats moet worden gedacht aan den ongunstigen invloed, dien de groei van de schimmel ondervindt van een lage pH. Bij een gelijk gehalte aan assimileerbaar fosphaat kan men verschillende gevallen onderscheiden bv.:

I. De combinatie cultuurvloestof—grond buffert slecht, dientengevolge zal de pH snel dalen en de groei van de schimmel remmen ondanks, dat door de lage pH meer fosphaat wordt opgelost.

II. De genoemde combinatie buffert beter en wel zoo, dat wel is waar de pH op den duur daalt, doch de schimmel voldoende tijd krijgt het meerdere in oplossing gegane fosphaat te assimileeren. Men vindt dan een hooger myceliumgewicht als in het vorige geval, alhoewel de grond in beide gevallen evenveel fosphaat kan bevatten.

III. De buffering is zeer goed, de groei van de schimmel wordt alleen bepaald door de hoeveelheid fosphaat, die bij de gegeven pH in oplossing gaat. Afhankelijk nu van de vraag, welke factor meer invloed uitoefent, de bevorderende invloed van het uitblijven der pH-daling op den groei, of het voor den groei van de schimmel nadeelige feit, dat nu geen extra fosphaat in oplossing wordt gebracht, zal men meer, minder of evenveel mycelium vinden, als in het tweede geval. Het is dus duidelijk, dat alhoewel de factoren

hoogere zuurgraad en betere fosphaatoplossing elkaar tegenwerken en hierdoor de verschillende neiging zullen vertoonen genivelleerd te worden, de slechte biologische buffering van de cultuurvloeistof van NIKLAS een juiste beoordeeling en een vergelijking der resultaten onderling ten zeerste bemoeilijkt.

Het komt ons voor, dat op grond van bovenstaande resultaten voor het P_2O_5 -onderzoek de door ons samengestelde cultuurvloeistof, geënt met de *Aspergillus* Groningen, de eischen, welke men voor een nauwkeurige bepaling moet stellen in zooverre benadert, dat aan de praktische toepassing der methode geen principieele bezwaren meer in den weg staan.

III. Vergelijking van de P_2O_5 -bepalingen in verschillende gronden volgens de methoden Neubauer en Lemmermann met de *Aspergillus*-methode

Om na te gaan in hoeverre de resultaten volgens de *Aspergillus*-methode overeenkomen met die van andere, veel toegepaste methoden om het P_2O_5 -gehalte in grondmonsters te bepalen, werden een 70-tal volgens de *Aspergillus*-methode verkregen P_2O_5 -getallen vergeleken met de P_2O_5 -getallen, die gevonden werden volgens de kiemplantenmethode van NEUBAUER en met de cijfers voor totaal P_2O_5 en in 1% citroenzuur oplosbaar P_2O_5 .

De in tabel XXV aangegeven getallen voor de *Aspergillus*-methode geven aan het aantal mg P_2O_5 in 100 g luchtdrogen grond en zijn uit de in tabel XXIII staande myceliumgewichten verkregen met behulp van de kurve, die behoort bij tabel XXII. (Het is wenschelijk om deze kurve zoo nu en dan te controleren met enkele P_2O_5 -oplossingen van bekende sterkte, omdat de aangegeven getallen aan kleine schommelingen onderhevig kunnen zijn.)

De Neubauer-getallen geven aan de volgens de Neubauer-methode in 100 g grond gevonden mg P_2O_5 , welke bepalingen door ons werden verricht met de vereenvoudigde methode volgens ECKSTEIN¹⁾.

Voor dit onderzoek werden gekozen verschillende grondtypen nl. zand-, zavel-, en kleigronden en ook kalkhoudende gronden. Over deze gronden zijn enkele gegevens in tabel XXV samengevat.

Bij dit onderzoek werd ook nagegaan de invloed van de fosphaatbemesting op den P_2O_5 -toestand van den grond. Uit tabel XXV blijkt wel duidelijk, dat de *Aspergillus*-methode, evenals alle andere methoden, duidelijk reageert op een fosphaatbemesting

In zeer vele gevallen, vooral bij de lichtere gronden, bestaat er een op-

¹⁾ O. ECKSTEIN. Arbeiten über Kali-Düngung (1931), blz. 86. Een gedeelte der Neubauer-bepalingen werd verricht door het Rijkslandbouwproefstation volgens de gebruikelijke voorschriften.

TABEL XXV

Perceelnummer	Grondsoort	Bemesting	Nummer	Humus in %	Klei in %	CaCO ₃ in %	mg P ₂ O ₅ in 100 g grond			
							Neu- bauer	totaal phosph.	Citr.z. oplosb.	Asp. Gr.
Pr 113 Hooghalen heide ontg.	zand	1) 0	41657	3 ³⁾	—	0	0	16	6	5
		100 P ₂ O ₅	41666	—	—	0,01	0,1	27	14	16
		900 P ₂ O ₅	41662	—	—	0,01	3	74	37	48
		100 P ₂ O ₅ + CaCO ₃ 900 P ₂ O ₅ + CaCO ₃	41673 41671	— —	— —	0,02 0	0,6 12	25 120	13 89	11 81
Pr 122 Hooghalen	zand	0	41558	3	—	0,01	0	13	5	0
		100 P ₂ O ₅	41559	—	—	0	0	21	9	5
		900 P ₂ O ₅	41583	—	—	0,01	13	74	60	52
		100 P ₂ O ₅ + CaCO ₃ 900 P ₂ O ₅ + CaCO ₃	41562 41586	— —	— —	0,01 0,01	0 —	20 82	9 65	8 66
Hooghalen	zand	2) stal mest + P KPN 0 KN KP	I	3	—	—	10	—	54	68
			IV	—	—	—	4	—	28	38
			VI	—	—	—	0,8	—	9	12
			IX	—	—	—	0,8	—	7	8
			X	—	—	—	4	—	22	29
Hooghalen proefveld	zand	100 P ₂ O ₅ 400 P ₂ O ₅ 900 P ₂ O ₅ 100 P ₂ O ₅ + CaCO ₃ 400 P ₂ O ₅ + CaCO ₃ 900 P ₂ O ₅ + CaCO ₃ pH veld B pH veld H	1-26	3	—	—	2	—	13	14
			3-22	—	—	—	1	—	14	16
			5-24	—	—	—	7	—	54	50
			18-33	—	—	—	2	—	7	11
			10-29	—	—	—	4	—	23	21
			12-31	—	—	—	6	—	33	32
			—	2,8	—	—	0,8	—	15	14
			—	—	—	0,37	1	—	20	24
Nieuwe gr. 48 Dinxperlo	zand	0 1200 super	36197	5	—	0,01	15	174	82	153
			36201	—	—	0	12	165	71	123
Nw. gr. Pr 102	zand	laagste trap	61366	8	—	—	4	± 97	33	60

	bouwland	150	53879	—	—	—	—	±	—	23	44	44	65
0051 Markelo	zand bouwland	0 100	53861 53851	7	—	—	—	2 6	±111 —	28 52	—	—	65 92
NH 48 Schagerbrug	zand grasland	0 150	57123 57153	12	—	—	—	20 32	— —	60 118	—	—	85 158
Pr. veld Lisse	duinzand kalkh.		56144	1,8	—	—	1,07	4	45	27	—	—	29
Pr 87 Emmercom- pascum	nieuwe dalgrond	0 P ₂ O ₅ 75 P ₂ O ₅ 100 P ₂ O ₅ 0 P ₂ O ₅ 200 P ₂ O ₅	41079 41182 41084 51489 51495	5,5 — — 6 —	— — — — —	— — — — —	0,01 0,002 0,01 — —	2 7 9 0 16	17 28 35 — —	6 17 25 11 50	—	—	6 15 34 12 65
Pr 119, Emmercom- pascum	nieuwe dalgrond	—	40442	8,6	0,25	—	3,6	21	21	18	—	—	19,5
Z. gr. 3 Bonger- compagnie	Oude dalgrond	0 60 P ₂ O ₅ 100 P ₂ O ₅	20697 20699 20701	13 — —	— — —	— — —	0 0,01 0,02	11 12 16	94 109 114	33 46 52	—	—	48 67 78
Pr 121 Idem	oude dalgrond	—	50992	6,3	—	—	0,13	7	119	76	—	—	72
Pr 8 Sappeneer	Oude dalgrond bouwland	NK NPK	30475 30473	25 —	— —	— —	— —	5 14	104 160	12 52	—	—	35 96

1) Bemest met primair Ca-phosphaat.

2) F als slakkenmeel.

3) De humus, klei, CaCO₃-bepalingen, werden door het Bedrijfslaboratorium voor Grondonderzoek verricht.

TABEL XXV (Vervolg)

Perceelnummer	Grondsoort	Bemesting	Nummer	Humus in %	Klei in %	CaCO ₃ in %	mg P ₂ O ₅ in 100 g grond			
							Neu- bauer	totaal phosph.	Citr.-z. oplosb.	Asp. Gr.
Pr 9, A. G. Mulder Smeer	Oude veen- kol. humus- grond	0 KPN stalmeest	41719	30	—	0	7	87	17	42
			41715	—	—	0	18	114	62	101
			41714	—	—	0	18	127	44	81
Z. gr. 3 Borgereompagnie	oude dalgrond	0 100	44329	14	—	—	5	—	33	57
			44333	—	—	—	8	—	56	88
Pr 123 Pieterburen	zavelgrond bouwland	0 super 0 altijd P	39375	2	17	0,03	5	74	21	13
			39374	—	—	0,05	7	78	25	21,5
			50291	2	17	—	3	—	22	18
			50290	—	—	—	7	—	32	27
Proeft. Eemskan. Groningen	klei-zand mengsel kalkh.	—	—	—	—	2,93	21	635	419	> 200
Pr 105 Eenrum	klei-grasl.	0 super + ZA	32309	12	45	0	27	193	48	70
			32303	—	—	0,01	31	214	68	94
Pr 118 de Waarden	klei-bouwl.	0 100 P ₂ O ₅ 0 P ₂ O ₅ 200 P ₂ O ₅	39363	2	37	0,14	3	105	21	20
			39362	—	—	0,14	5	113	20	26
			59188	—	—	—	2	—	20	17
			59187	—	—	—	11	—	33	39
Pr 109 Steenh.	klei-grasl.	0 super + ZA	32249	15	62	0	34	297	110	> 200
			32243	—	—	0	34	335	130	> 200
V 5 Vleuten	klei-grasl.	0 150	45010	5	—	—	9	—	16	24
			45023	—	—	—	33	—	84	40
GO 75	klei	—	monster 1919	2,7	7,2	4,44	9	187	53	64
Carel Coenraadpolder	klei zeer kalkrijk	—	—	—	—	10,24	8	177	36	68
Pr 1 1933	kalkh. zavel	—	44011	—	25	2,77	9	105	33	32

merkelijke overeenkomst tusschen het aantal mg in citroenzuur oplosbaar P_2O_5 en de Aspergillus-waarden. De overeenkomst tusschen de Aspergillus-methode en de Neubauer-methode is minder sprekend, alhoewel de algemeene tendens in de volgens Neubauer bepaalde waarden zich in een aantal gevallen duidelijk in de Aspergillus-cijfers weerspiegelt.

Wat betreft de aan de fosphaat-bepalingen klevende fout, blijkt dat, wanneer men de bepalingen in triplo doet, de m.f. $\pm 2,5$ % bedraagt, terwijl alleen bij de laagste fosphaatgehalten, alzoo in het begin van de kromme, de fout iets hoger is, nl. ± 5 %.

Een dergelijke nauwkeurigheid gaat verre uit boven die, welke met de Neubauer-methode te bereiken is en de reproduceerbaarheid der bepalingen nadert zelfs die der chemische methoden.

De waardeering der verkregen fosphaatcijfers voor de practijk

De waarde eener methode is tenslotte alleen te beoordeelen aan de hand van gegevens betreffende de reactie der gewassen op bemesting te velde. In een aantal gevallen zijn deze gegevens van de door ons onderzochte gronden beschikbaar; het is echter duidelijk, dat een definitief oordeel slechts gebaseerd kan zijn op een veel uitgebreider, statistisch te verwerken, materiaal, waarvan het onderzoek zich zoowel over verschillende jaren als over verschillende gewassen uitstrekt.

Bij de interpretatie van langs chemischen of biologischen weg verkregen fosphaatgehalten zijn een aantal factoren in het oog te houden, die al naar gelang van de omstandigheden een verschillend gewicht in de schaal leggen. Zoo zal een phosphorzuurgetal van een zwaren kleigrond een geheel andere waarde kunnen hebben dan hetzelfde getal voor een zandgrond. Tevens zal men met de te verbouwen gewassen rekening moeten houden; zoo kan het voorkomen, dat een gewas als rogge met een bepaalden phosphorzuurvoorraad ruimschoots toe zal kunnen, terwijl op hetzelfde land aardappels onder dezelfde omstandigheden fosphaatgebrek lijden en te weinig opbrengen.

Daarnaast moet worden opgemerkt, dat de Aspergillus-methode in zoo-verre van de gewone extractie verschilt, dat speciaal in die gevallen, waarin de grond een reserve-voorraad fosphaat of kali bezit, de schimmel ook hiervan een gedeelte assimileeren kan. Bij de chemische extractie stelt zich een statisch evenwicht in tusschen een bepaalde hoeveelheid vloeistof en de fosphaathoudende bestanddeelen van den grond. Daarmee is doorgaans de fosphaatvoorraad in den grond niet uitgeput, men kan door herhaalde extractie er meestal nog heel wat meer uithalen; men beperkt zich echter tot een enkele extractie.

De schimmel daarentegen verbruikt een deel van het in oplossing gegane fosphaat, waardoor gestadig het oplossingsevenwicht verstoord wordt. De mogelijkheid bestaat dus, dat fosphaat of kali nageleverd wordt uit den aanwezigen voorraad, zoodat men op deze wijze een meer dynamisch verloop krijgt.

Bij gronden, die weinig moeilijk toegankelijk fosphaat bevatten, zal ook de nalevering niet veel te beteekenen hebben; hier is een goede overeenstemming tusschen de P-citr- en P-Aspergillus-cijfers te verwachten, met eenige neiging naar den hoogen kant. (Vergel. de Hooghalensche gronden, Pr 87; Pr 118).

Bij gronden met een groote voorraad weinig oplosbaar fosphaat daarentegen is te verwachten, dat de Aspergillus-cijfers duidelijk hooger zijn dan de P-citr.getallen. Wij zien dit o.a. bij de gronden van Dinxperlo (NG 48), bij Pr 109 en bij Pr 9 Nr. 41 715.

Dat er in een aantal gevallen toch groote verschillen bestaan tusschen de P-totaal en de P-Aspergillus-cijfers moet o.i. worden toegeschreven aan het feit, dat Aspergillus wel in staat is de in de citroenzuur-houdende vloeistof gemakkelijk oplosbare phosphaten te assimileeren, echter geenszins *alle* phosphaten kan opnemen.

Wanneer P-totaal en P-Aspergillus elkaar naderen, terwijl P-totaal en P-citroenzuur ver uit elkaar liggen, zou dit in een aantal gevallen kunnen wijzen op een voorraad in citroenzuur bij herhaalde extractie oplosbaar en assimileerbaar fosphaat (bijv. NG 48, Pr 9 Nr 41 715, Pr 109). Verschillen deze cijfers daarentegen duidelijk van elkaar, dan zou men daaruit wellicht kunnen concludeeren, dat de grond weliswaar een hoeveelheid fosphaat bevat, maar dat deze slecht assimileerbaar is. (Pr 119; Pr 8 Nr. 30 475.).

In dit verband vraagt Pr 9 onze aandacht, waar het voortdurend met anorganische meststof bemeste perceel (N°. 41 715) vergeleken is met een perceel (N°. 41714), dat ettelijke jaren stalmest gehad heeft. Het verschil tusschen P-totaal en P-Asp. bedraagt in het eerste geval slechts 13 mg (P-citr. daarentegen 52 mg), in het tweede geval 46 mg. De veronderstelling ligt voor de hand, dat in den anorganisch bemesten grond de phosphaten grootendeels in citroenzuur oplosbaar en voor de schimmel gemakkelijk te bereiken zijn; in den met stalmest bemesten grond is een deel der phosphaten in organische verbindingen vastgelegd, die veel minder in citroenzuur oplossen (P-citr verschilt 83 mg van P-totaal) en die weliswaar een zekere nalevering vertoonen, doch voor een groot deel in dezen organischen vorm voor de schimmel onbereikbaar zijn.

Wij zien hier in ieder geval enkele frappante verschillen tusschen de gegevens, welke met de drie methoden verkregen worden, naar voren komen, waardoor ons inzicht in de phosphorzuurverhoudingen in den grond wellicht verdiept kan worden.

Zooals reeds hierboven vermeld, dient men bij de beoordeeling der verkregen fosphaatgetallen rekening te houden met een aantal uiteenlopende factoren, waarvan de volgende naar voren gebracht mogen worden:

1. *De grondsoort*: Alhoewel er aanwijzingen zijn, dat bij de waardeering der gevonden getallen met de grondsoort rekening gehouden moet worden, is hierover nog te weinig met zekerheid bekend om dit in cijfers te kunnen uitdrukken.

2. *De te verbouwen gewassen*. Het is een algemeen bekend feit, dat verschillende gewassen vrij sterk uiteenlopende fosphaatbehoeften vertoonen. (Zoo neemt bijv. een goede oogst fabrieksaardappelen 60—70 kg P_2O_5 per ha op, tegen tarwe 45 kg en gerst 32 kg). Ook verschillen de gewassen onderling vrij sterk in hun vermogen om de natuurlijke, weinig oplosbare fosphaten te assimileeren; sommige kunnen zich geheel zelfstandig voeden, andere zijn aangewezen op de medewerking van micro-organismen in de rhizosfeer.

In ieder geval moet men bij de beoordeeling onderscheid maken tusschen bouw- en grasland; van het laatste wordt nl. slechts de 5 cm dikke zode bemonsterd, tegen 15—20 cm van den bouwkuin op bouwland. Bij grasland kan men bij een zelfde bemestingstoestand doorgaans hogere cijfers verwachten.

3. *De pH en de verzadigingstoestand van het bodemcomplex*. Naarmate een grond meer met kalk verzadigd is en alcalischer reageert, zullen de aanwezige fosphaten, althans voor een aantal gewassen, moeilijker opneembaar worden.

4. *De vastlegging*. Deze hangt o.a. af van de samenstelling van het adsorbeerend bodemcomplex en wel in hoofdzaak van het kalkgehalte en van het gehalte aan reactieve ijzerverbindingen¹⁾.

Een juiste waardeering van de verkregen cijfers zal alleen mogelijk zijn, wanneer wij over een uitgebreid proefveld-materiaal beschikken, waarbij de reactie van verschillende gewassen op bepaalde bemestingen nauwkeurig is nagegaan. In geen geval zal men kunnen volstaan met een uniformen maatstaf, men zal echter wel voor bepaalde grondtypen en te verbouwen gewassen normen kunnen aangeven, die het geven van bemestingsadviezen zullen vergemakkelijken.

Voor practijkdoeleinden zal het in sommige omstandigheden voldoende

¹⁾ In gronden, die gereduceerd zijn of geweest zijn, kunnen oplosbare ferroverbindingen voorkomen, die het fosphaat als ferrophosphaat vastleggen, hetwelk bij oxydatie in ferriphosphaat overgaat, dat voor de plant moeilijk opneembaar is.

zijn, wanneer wij beschikken over een vlugge, goedkoope methode, die reproduceerbare waarden geeft en waarmede men bijv. een viertal trappen zou kunnen onderscheiden:

- I. De grond is zeer arm, een flinke bemesting is vereischt;
- II. Er is kans op een tekort, een normale bemesting is aan te bevelen;
- III. Er is voldoende, bemesting voor dit jaar kan verminderd of weggelaten worden;
- IV. De grond bevat een flinken voorraad, bemesting is in de eerste jaren overbodig.

Over de voor dit onderzoek uitgekozen gronden was een aantal gegevens bekend, die een oriëntering in deze richting mogelijk maken; het betrof hier meestal proefvelden, waarvan de grond geregeld onderzocht en de oogst gewogen was en men zich op grond der verkregen resultaten een oordeel had kunnen vormen over den bemestingstoestand. De door Dr. F. VAN DER PAAUW opgemaakte beoordeeling der bemestingsresultaten van een aantal proefvelden wordt nu in het volgende met de Aspergillus-cijfers vergeleken.

Bijzonderheden over den grond	Bemesting	Bemestingsresultaten	Beoordeeling	P-Aspergillus
A. Zand en Dalgronden				
Pr 113. Heide-ontginning; humus-arme leemhoudende zandgrond	0 P_2O_5	33 kg aardappelen	Zeër sterk P-gebrek	4
	100 "	120 " "	Sterk P-gebrek	16
	400 "	201 " "	Bemestingstoestand nog niet optimaal	48
Hooghalen	900 "	211 " "	Bemesting voldoende	81
Pr 123. Als Pr 113	0 P_2O_5	Als Pr 113	Zeër sterk P-gebrek	0
	100 "		Idem	5
	400 "		Bemestingstoestand nog niet voldoende	52
	900 "		Verdere bemesting geen voordeel	66
Proefveld Hooghalen. Als Pr 113	Geen bemesting (geen P_2O_5)	Opbrengst minimaal	Zeër sterk P-gebrek	12
	K en N, geen P	Idem	Idem	8
	K, P en N	Opbrengst nog niet optimaal	Bemesting ontoereikend	38
	Stalmest en fosphaat	Opbrengst behoorlijk	Bemesting voldoende	68

Bijzonderheden over den grond	Bemesting	Bemestings- resultaten	Beoordeeling	P- Asper- gillus
NGe 48, Dinxperlo, zandgrond met 5 % humus	Geen P_2O_5	Het resultaat van driejarige bemes- tingsproeven is, dat aardappelen, voederbieten noch tarwe op P-bemesting re- ageerden	Flinke voorraad phosphaat aan- wezig	123
	1200 kg/ha super	Idem	Idem	153
NGe 102, Dinxperlo, zand-bouwland met 6 % humus	Laagste trap	Aardappelen brach- ten door bemes- ting 6 % meer op, haver reageerde niet	Normale bemesting aan te bevelen	60
	Hoogste trap	Opbrengst normaal	Bemesting over- bodig	106
PO 2, Heino, zand- bouwland met 6 % humus	Geen P_2O_5	Phosphaat-bemes- ting gaf opbrengst- vermeerderingen bij alle gewassen, varieerend van 2—13 %	Normale bemesting aan te bevelen	44
	150 „	Opbrengst voldoende	Verdere bemesting overbodig	65
OO 51, Markelo, bouwland op zand met 7 % humus	Geen P_2O_5	Rogge, aardappe- len, rogge gaven resp. 15%, 11% en 12% meer door bemesting	Normale bemesting vereischt	65
	100 „	Opbrengst normaal	Verdere bemesting overbodig	92
NH 48, Schagerbrug, grasland op zand met 12 % humus; zodelaag van 0—5 cm	Geen P_2O_5	Het gewas reageerde niet op P-bemes- ting	Bemesting over- bodig	85
	150 „	—	Grond bevat een duidelijken voor- raad	158
Pr 87, Emmercom- pascum, nieuwe dalgrond met 5— 6 % humus	Geen P_2O_5	Door bemesting steeg de aardap- pelopbrengst met 31—35 %, de tarwe-opbrengst met 40 %. Met 75—100 kg P_2O_5 is de grens bereikt	Ernstig phosphaat- gebrek	6

Bijzonderheden over den grond	Bemesting	Bemestings- resultaten	Beoordeeling	P- Asper- gillus
Pr. 87. Emmercom- pascum, nieuwe dalgrond met 5— 6 % humus	75 "	—	Normale bemesting nog aan te raden	15
	100 "	—	Bemestingstoestand voldoende	34
	0 "	—	Ernstig P-gebrek	12
	200 "	—	Bemestingstoestand voldoende	55

(Bij Pr. 87 moet worden opgemerkt, dat in dezen grond vrijwel geen vastlegging optreedt en het oplosbare fosphaat na den oogst gedeeltelijk uitgespoeld wordt (bij een bemesting met 100 kg P_2O_5 bedroeg dit zelfs 15—30 kg binnen een jaar). Onder deze omstandigheden is het niet te verwonderen, dat de bovenstaande cijfers, die afkomstig zijn van monsters, welke *na* den oogst genomen zijn, geen juisten indruk geven van den toestand direct na de bemesting. Wel kan men de bemestingstrappen erin terugvinden, alle cijfers wijzen echter op de noodzakelijkheid van hernieuwde bemesting. Dit is inderdaad in overeenstemming met de praktijkervaring, dat op dit land jaarlijks een fosphaatbemesting van 75—100 kg P_2O_5 noodig is.)

Bijzonderheden over den grond	Bemesting	Bemestings- resultaten	Beoordeeling	P- Asper- gillus
Pr 119, Emmercom- pascum, als Pr 87	—	Monster na den oogst genomen	Bemesting is aan te raden	20
ZGr 3, Borgercom- pagnie, oude dal- grond met 13 % humus	Geen P_2O_5	Tarwe bracht door bemesting met 60 kg P_2O_5 reeds het max. op. Ver- meerdering door bemesting bij tarwe 4—5 %, aardappelen 7,5 en 11,5 %	Matige bemesting aan te bevelen, vooral voor aard- appelen	48
	60 "	—	Verdere bemesting overbodig	67
	100 "	—	Idem	78
Borgercompagnie, als boven	Geen P_2O_5	Als boven	Matige bemesting aan te bevelen	67
	100 "	—	Bemesting over- bodig. Geen reservevoor- raad	88

Bijzonderheden over den grond	Bemesting	Bemestings- resultaten	Beoordeeling	P- Asper- gillus
Pr 121, Borgercom- pagnie, oude dal- grond met 6 % humus	—	Monster afkomstig van een kalktoe- standsproefveld, waarvan de phos- phaattoestand be- vredigend wordt geacht	Bemesting over- bodig	72
Pr 8, Sappemeer, oude dalgrond met 25 % humus	N. K.	Aardappelen brach- ten 25% meer op door bemesting met fosphaat; rogge 27,5 %; haver reageerde merkwaardiger- wijze niet; zomer- tarwe leverde 15 % meer op	P-bemesting beslist noodig	35
	N. P. K.	—	Bemestingstoestand is voldoende	96
Pr 9, Sappemeer, als boven	Geen bemesting	Hiervoor geldt het- zelfde als voor Pr 8	P-bemesting noodig	42
	K. P. N.	—	Bemestingstoestand is voldoende	101
	Stalmest	—	Idem	81
B. Klei- en zand- gronden				
Pr 123, Pieterburen, zavelgrond met 2% humus, bouwland	Geen bemesting	Deze grond ver- toont een licht P-gebrek. Tarwe gaf door bemes- ting 3-6% meer, koolzaad 3 %, klaver 5-10 %, Waalsche boonen zelfs 20 %	Normale bemesting aan te bevelen	13
	Super	—	Matige bemesting noodig	22
	Geen bemesting	—	Normale bemesting aan te bevelen	18
	P.	—	Verdere bemesting overbodig	27
Groningen, Proeftuin RLPS, Eemskanaal, klei- zandmengsel, kalk- houdend	Geen bemesting	Deze grond bevat groote hoevee- heden gemakke- lijk opneembaar fosphaat, re- ageert dan ook niet op P-bemesting	Flinke voorraad P ₂ O ₅ aanwezig	> 200

Bijzonderheden over den grond	Bemesting	Bemestings- resultaten	Beoordeeling	P- Asper- gillus
Pr 105, Eenrum, klei- grasland met zeer veel humus (12 %) en zonder kalk	Geen bemesting	Deze grond staat bekend als in een goeden bemestingstoestand te verkeer	Bemesting overbodig	70
	Super + Z. A.	—	Idem, bevat waarschijnlijk zelf een behoorlijken reserve-voorraad P_2O_5	94
Pr 118, de Waarden, bouwland, zware zavel, met 2 % humus	Geen bemesting (2 jaren geen P-bemesting)	Te vergelijken met Pr 123. Door phosphaatbemesting ontstonden bij tarwe, erwten en bieten meer opbrengsten varieërend tusschen 4 en 8 %, voederbieten echter gaven 26 % meer	Normale bemesting aan te bevelen	20
	100 kg P_2O_5	—	Verder matige bemesting noodig	26
	Geen bemesting (4 jaren geen P-bemesting)	—	Ruime bemesting aan te bevelen	17
	200 kg P_2O_5	—	Verdere bemesting overbodig	39
Pr 109, Baard (Fr.), klei-grasland met 15 % humus	Geen bemesting	Dit land is bekend als een buitengewoon P-rijken kleigrond, die in het geheel niet op P-bemesting reageert	Flinke voorraad P_2O_5 aanwezig	> 200
	Super + Z. A.	—	Idem	> 200
U 5, Vleuten, klei-grasland met 5 % humus	Geen bemesting	Deze grond leverde door bemesting met phosphaat 20 à 30 % meer op en is te beschouwen als zeer arm aan opneembare phosphaten. Dit teekent zich ook af in het P_2O_5 -gehalte van het hooi	Flinke bemesting noodig	24
	150 P_2O_5	—	Verdere P-bemesting overbodig	40

Bijzonderheden over den grond	Bemesting	Bemestings- resultaten	Beoordeeling	P- Asper- gillus
Carel Coenraadpol- der, klei met 10 % CaCO_3	Geen bemesting	In een dergelijke recente inpolde- ring (1925) bevat de grond voldoende phosphaat om jaren onbemest te kunnen blijven	Voorraad P_2O_5 aan- wezig	68
Pr 1, Zavelperceel, Proefstation, 2,8 % CaCO_3	Geregeld nor- maal bemest	Dit is een oude zavelgrond, die geregeld bemest is geworden en dientengevolge wel zooveel P_2O_5 bevat, dat een enkele maal be- mesting zonder schade achterwe- ge kan blijven	P-bemesting over- bodig, althans dit jaar	32

Beperken wij ons allereerst tot de *zand- en dalgronden*, dan blijkt dat bij P-Aspergillus-getallen van:

4, 0, 5, 12, 8, 6, 12 en 16 *sterk fosphaatgebrek heerschte*;

bij 20, 48, 52, 38, 60, 44, 48, 57, 65, 35, 42 *een bemesting vereischt of aan te bevelen was*;

bij 81, 66, 68, 106, 92, 85, 78, 96, 101, 81, 88, 67 *bemesting overbodig was*
bij 123, 153 en 158 *de grond een flinke reservevoorraad P_2O_5 bevatte*.

Op grond van deze cijfers zouden wij voor zand- en dalgronden *voorloopig* de volgende grenzen op kunnen stellen:

0—19: sterk tot zeer sterk fosphaatgebrek;

20—60: normale bemesting gewenscht;

61—120: verdere bemesting, althans voor een jaar, overbodig;

boven 120: de grond bevat een flinken reserve voorraad P_2O_5 .

Van de onderzochte gronden kunnen dan aan de hand van deze schaal 35 van de 38 in de groepen worden ondergebracht, waarin zij volgens de proefveldresultaten behooren. De grond van Markelo, die bij een P-asp. van 65 nog duidelijk bemesting nodig heeft, valt er buiten, evenals de beide cijfers van Pr. 87, die om de reeds aangegeven redenen geen juist beeld van de toestand geven.

Beschouwen wij vervolgens de klei- en zavelgronden, dan zien wij bij P-Aspergillus-getallen van:

13, 22, 18, 20, 17, 24, 26 een matige tot flinke bemesting noodig was; bij 27, 32, 39, 40 bemesting overbodig was en bij 200, 200, 200, 68, 70, 94 een duidelijke reservevoorraad voor meerdere jaren aanwezig was.

Het aantal onderzochte gronden is hier kleiner dan bij de zandgronden en is in ieder geval te gering om met eenige zekerheid reeds nu grenzen vast te stellen. Er zijn aanwijzingen, dat die grenzen hier lager liggen dan bij zandgronden. Zeer voorloopig zou men kunnen zeggen, dat tusschen 10 en 26 bemesting aan te bevelen is, terwijl bij een P-Aspergillus-getal van boven 26 in de meeste gronden fosphaatbemesting geen voordeel meer brengt.

Getallen boven 70 geven een aanwijzing, dat de grond reeds een reservevoorraad assimileerbaar fosphaat bevat, terwijl boven 200 de grond rijkelijk van fosphaat voorzien is.

Opmerkelijk is, dat de grond van den Carel Coenraadpolder, met een cijfer van 68, toch een flinke voorraad fosphaat moet bevatten, waarop het P-totaalcijfer van 177 wijst.

Dat dit Aspergillus-getal niet hooger is, kan misschien veroorzaakt worden, doordat de fosphaatvoorraad gedeeltelijk in organischen vorm aanwezig is, of in de bodem-mineralen opgesloten zit en slechts geleidelijk ter beschikking komt. In ieder geval kan het vinden van zulk een cijfer aanleiding zijn, dat dergelijke gevallen eens aan een nader onderzoek worden onderworpen.

Gezien de hooge Neubauer- en P-totaalcijfers, is het ook te verwachten, dat de grond van Eenrum (Pr 105) een behoorlijke reserve-voorraad fosphaat bevat, weshalve wij ook deze grond in de laatste categorie hebben ondergebracht. Voor de practijk-beoordeeling maakt het weinig verschil, daar het in ieder geval vaststaat, dat deze gronden het eerstvolgende jaar niet bemest behoeven te worden; in dergelijke dubieuze gevallen kan men dan den grond het volgend jaar nog eens laten onderzoeken.

Om over de waarde der methode een definitief oordeel te kunnen vellen, is het noodig de bepalingen bij een veel uitgebreider materiaal te verrichten, de resultaten statistisch te bewerken en met de andere methoden te vergelijken, waarbij dan in het bijzonder aandacht moet worden besteed aan de wijze, waarop de op de betreffende gronden groeiende gewassen op fosphaatbemesting reageeren ¹⁾.

Op grond van de hierboven verrichte onderzoeken kan wel aangenomen worden, dat met behulp van de Aspergillus-methode een indruk te krijgen is van de hoeveelheid assimileerbaar fosphaat, die een grond bevat en in een

¹⁾ Deze onderzoeken zijn op het oogenblik, in samenwerking met andere onderzoekers aan het Rijkslandbouwproefstation ter hand genomen en zullen te gelegener tijd afzonderlijk gepubliceerd worden.

aantal gevallen duidelijke aanwijzingen verkregen kunnen worden of de grond bemesting al dan niet van noode heeft.

Een groot voordeel van de *Aspergillus*-methode is de eenvoudige uitvoering, die bepalingen in groote reeksen mogelijk maakt, terwijl de kosten per bepaling gering zijn, zooals in 't volgende nog nader zal worden uiteengezet.

B. KALIBEPALINGEN

I. Wijzigingen in de samenstelling van de voedingsoplossing

Toevoeging van sulfaten en de invloed van natrium

Het onderzoek met den stam *Aspergillus niger* Groningen werd voor de kalibepalingen in grond voortgezet met de bij het fosphaat-onderzoek samengestelde voedingsoplossing. Hier werd echter, evenals dit door TRISCHLER gedaan wordt, in de plaats van 0,02 % K_2O als K_2SO_4 , 0,075 % P_2O_5 als $(NH_4)H_2PO_4$ toegevoegd. De samenstelling van de voedingsoplossing werd nu als volgt:

10 %	saccharose
1 %	citroenzuur
0,4 %	ureum
0,075 %	P_2O_5 als $(NH_4)H_2PO_4$
0,03 %	$MgSO_4$
0,00005 %	Cu als $CuSO_4$
0,0005 %	Fe als $FeSO_4$
0,0002 %	Zn als $ZnSO_4$
0,0001 %	Mn als $MnSO_4$

Verder werd per kolfje toegevoegd 1,25 g Ca-citraat en 12,5 mg humuszuur.

Bij deze voedingsoplossing is dus het S-gehalte gedaald, doordat het K_2SO_4 aan deze oplossing ontbreekt. Het is dus mogelijk, dat bij den groei van *Aspergillus* op deze oplossing S-gebrek optreedt. Om dit na te gaan werden aan de voedingsoplossing verschillende sulfaten, zooals ammonium-, natrium-, en calciumsulfaat toegevoegd. Tevens werd bij deze proef nagegaan, in hoeverre toevoeging van natrium aan de voedingsoplossing van invloed was op den groei van *Aspergillus niger*. Toevoeging van natrium is vooral van belang bij bepalingen van kalium in den grond, omdat hier een wisselwerking tusschen het zich in gebonden toestand in den grond bevindende K_2O en het toegevoegde natriumsulfaat kan optreden. Het constant blijven van de begin- en eind-pH van de voedingsoplossing is voor de kalibepalingen van minder belang dan voor de fosphaatbepalingen. Toevoeging van een

kleine overmaat sulfaten, waaruit tijdens den groei van de schimmel zwavelzuur kan ontstaan, is dus geen overwegend bezwaar voor de kalibepalingen.

Bij de nu volgende proef werden aan de kolfjes toegevoegd:

0,04 % SO_3 als $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 0,02 % 0,04 % en 0,06 % SO_3 als Na_2SO_4 en
 0,04 % SO_3 als CaSO_4

TABEL XXVI

Toegevoegde zwavelbron	Myceliumgewicht
	1,77
0,04 % SO_3 als $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,75
0,02 % SO_3 als Na_2SO_4	2,13
0,04 % SO_3 als Na_2SO_4	2,32
0,06 % SO_3 als Na_2SO_4	2,31
0,04 % SO_3 als CaSO_4	1,69

Als kaliumbron werd per kolfje toegevoegd 0,006 % K_2O . Stam Groningen. Cultuurtijd 4 dagen bij 37°C . Geënt met 3 druppels entsuspensie. De myceliumgewichten zijn de gemiddelde gewichten van drie bepalingen.

Vergelijkt men de bij deze proef gevonden myceliumgewichten onderling, dan blijkt, dat verdere toevoeging van SO_4 geen invloed meer heeft op den groei van *Aspergillus*, aangezien zoowel $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als CaSO_4 geen vermeerdering van mycelium geven. Toevoeging van Na_2SO_4 geeft echter een aanzienlijke myceliumgewichtsvermeerdering, die echter boven de concentratie van 0,07 % Na_2SO_4 (= 0,04 % SO_3) niet meer toeneemt. Deze myceliumgewichtsvermeerdering kan echter niet worden toegeschreven aan de toevoeging van S aan de voedingsoplossing, maar moet worden veroorzaakt door het in de voedingsoplossing aanwezige natrium. Het voor deze proef gebruikte Na_2SO_4 was twee keer omgekristalliseerd; om na te gaan of het misschien ook sporen K bevatte, werd ook 0,04 % SO_3 als Na_2SO_4 toegevoegd aan een oplossing, die geen K_2O bevatte. Het bleek, dat zich dan slechts weinig mycelium ontwikkelde, dat na drogen en wegen 0,10 g bedroeg. De myceliumgewichtsvermeerdering bij deze proef moet dus worden veroorzaakt door toevoeging van natrium. De geringe hoeveelheid mycelium, die zich bij de blinde proef vormde, kan ook gedeeltelijk worden veroorzaakt door sporen K uit het glas van de erlenmeyers. Ook BUROMSKY ¹⁾ vond bij zijn onderzoekingen dat culturen met natrium, maar zonder kalium, zich even slecht ontwikkelen als culturen zonder natrium en kalium. Natrium heeft dus volgens hem geen

¹⁾ BUROMSKY. *Fortschr. Org. Chem.* 15 175 (1912).

belang als voedingsstof. Volgens WEHMER ¹⁾ kan de schimmel zonder kalium, maar bij aanwezigheid van natrium, zich wel ontwikkelen, indien men de schimmel maar voldoende lang cultiveert. WEHMER gebruikt een cultuurtijd van eenige weken. Volgens VILSMEIER ²⁾ zijn voor de practische uitvoering van de Aspergillus-methode de in den grond aanwezige Na-zouten, in vergelijking met den grooteren invloed op de myceliumvorming van de kaliumzouten, van geen belang. Volgens hem geldt ditzelfde ook voor proeven met de zuivere voedingsoplossingen.

VILSMEIER vond wel, dat de myceelgewichten bij de blinde proef wel iets hooger zijn, wanneer aan de voedingsoplossing 0,6 % Na_2SO_4 wordt toegevoegd. In tegenstelling met hetgeen VILSMEIER vond, blijkt uit onze proef, dat aan natrium, *in tegenwoordigheid van kalium*, zeer zeker een aanzienlijke invloed op den groei van Aspergillus niger moet worden toegeschreven. Deze invloed van natrium stijgt tot een concentratie van 5 millimol $\text{Na}_2\text{SO}_4/\text{l}$ (= 0,04 % SO_3) in de voedingsoplossing. Gaat men de hoeveelheid Na nog vergrooten, dan vindt geen verdere myceliumgewichtsvermeerdering plaats. Toevoeging van natrium aan de blinde voedingsoplossing is ook hier, evenals bij VILSMEIER, van weinig invloed op den groei.

Voor bepalingen van K_2O in grondmonsters is het zaak, om de voedingsoplossing zoo te kiezen, dat deze maximale myceliumgewichten geeft. Naar aanleiding van het bovenstaande werd dan ook besloten om in het vervolg aan de voedingsoplossing voor den stam Groningen steeds 5 m. mol/l. Na_2SO_4 toe te voegen. Door deze toevoeging wordt tevens bereikt, dat de eventueel in den grond of in de verschillende chemicaliën steeds voorkomende sporen Na- van geen invloed meer zijn op den groei.

Toevoeging van kiezelzuur, Na-permutiet en $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ aan de voedingsoplossing

Volgens VILSMEIER ³⁾ blijkt bij chemische analyse van de gedroogde mycelia, afkomstig van een voedingsoplossing met grond, dat deze steeds, behalve Ca, ook een geringe hoeveelheid SiO_2 bevatten. Wanneer de gebruikte grond echter veel Ca bevatte, is het SiO_2 -gehalte laag, bij laag Ca-gehalte hooger.

Bij het onderzoek van de Aspergillus-methode met den stam Groningen wordt echter steeds 1,25 g Ca-citraat per kolfje toegevoegd, zoodat het Ca-gehalte van de voedingsoplossing steeds hoog is.

¹⁾ WEHMER. *Bot. Ztg.* 49 (1891).

²⁾ G. VILSMEIER. Diss. Beitrage zu den chem. Grundlagen der Asp. Methode 699 (1931).

³⁾ G. VILSMEIER. Diss. München 699 (1931).

Aan de volledige voedingsoplossing werd tot dusverre nooit SiO_2 toegevoegd. Tijdens het verdere onderzoek bleek echter, dat bij enkele zware kleigronden het gevonden myceliumgewicht iets hoger was dan het hoogste met de zuivere voedingsoplossing gevonden myceliumgewicht. Deze verschillen zijn niet groot, het hoogste met de zuivere voedingsoplossing gevonden myceliumgewicht is 2,80 g per kolfje en het hoogste met een kleigrond gevonden gewicht is 2,97 g per kolfje. Het is ook heel goed mogelijk, dat dit hogere myceliumgewicht gevonden werd, doordat de mycelia erg dik zijn, waardoor de aanhangende kleideeltjes moeilijk te verwijderen zijn.

Om de invloed van SiO_2 , Na-permutiet en aluminiumsulfaat op den groei na te gaan, werden deze stoffen toegevoegd aan een voedingsoplossing met 0,04 % K_2O , terwijl tevens een blanco proef werd aangezet met 0 % K_2O . Het gebruikte SiO_2 is een colloïdale kiezelzuuroplossing.

TABEL XXVII

K_2O in %	Toegevoegde hoeveelheid stof	Myc. gew.
0,04	Zonder bijvoeging	1,47
0,04	0,3 gr. Na-permut.	1,61
0,04	0,3 gr. Kiezelz. opl.	1,59
0,04	0,1 gr $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	1,44
0,04	0,3 gr. $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	1,40
0	0,3 gr. Na-permut.	0,31
0	0,3 gr Kiezelz. opl.	0,27

Cultuurtijd 4 dagen bij 37° C. Stam Groningen. Geënt met 2 ösen van een plaat.

Uit de tabel is te zien, dat $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ geen invloed op den groei heeft. Ook de invloed van Na-permutiet en van kiezelzuur is niet te constateeren; de hier optredende myceelgewichtsvermeerderingen worden veroorzaakt door verontreinigingen met kalium, zooals blijkt uit de met de blanco kaliumproef verkregen opbrengsten. Toevoeging van een dezer stoffen aan de cultuurvloeistof is alzoo niet noodzakelijk.

II. Vergelijking van den groei en van de pH-veranderingen in de zuivere voedingsoplossing van den stam Groningen en de stam Poschenrieder

De K_2O -kurve met de zuivere voedingsoplossing

Voor de kalibepaling met den stam Groningen werd de volgende definitieve voedingsoplossing gebruikt welke bevat:

(56) A 184

10 % saccharose	0,00005 % Cu als CuSO_4
1 % citroenzuur	0,0005 % Fe als FeSO_4
0,4 % ureum	0,0002 % Zn als ZnSO_4
0,075 % P_2O_5 als $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$	0,0001 % Mn als MnSO_4
0,03 % MgSO_4	0,03 % Na_2O als Na_2SO_4

terwijl verder per erlemeyerkolfje van 300 cm³ met 75 cm³ voedingsvloeistof werd toegevoegd:

1,25 g Ca-citraat en

12,5 mg humuszuur (met NaOH geneutraliseerd).

Voor het bepalen van de kali-kurve werden stijgende hoeveelheden K_2O in den vorm van K_2SO_4 aan de voedingsoplossing gevoegd. De cultuurtijd bedroeg ook bij de kalibepalingen 4 dagen, bij een temperatuur van 37° C. Geënt werd met 3 druppels entsuspensie, die op de reeds vroeger beschreven wijze bereid werd.

Het is voor de kalibepalingen noodzakelijk, om zoo zuiver mogelijke saccharose te gebruiken. Het was gebleken, dat de gewone handelssuiker vaak met sporen kali verontreinigd is, waardoor deze dus niet voor kalibepalingen te gebruiken is. Bij ons onderzoek werd daarom verder gebruik gemaakt van chemisch zuivere saccharose¹⁾. De bepalingen voor deze theoretische kurve werden verricht met 4 parallel-bepalingen. De 4 geoogste mycelia werden ieder afzonderlijk gefiltreerd, gedroogd en gewogen, waarna het gemiddelde myceliumgewicht per kolfje bepaald werd. De na 4 dagen verkregen mycelia van den stam Groningen zijn niet met sporen bedekt, ze zijn gemakkelijk te oogsten en vormen goed aaneensluitende lagen. Bij de K_2O -kurve daalt de pH tijdens den groei iets meer dan bij de fosphaat-kurve. Deze meerdere daling wordt veroorzaakt door de toevoeging van Na_2SO_4 . Ook hier is weer de pH-daling het grootste, wanneer het myceelgewicht bijna maximaal is. Bij de hoogste K_2O -concentraties nl. 0,012 en 0,015 wordt de pH-daling weer kleiner. Hier treedt proteolyse van het mycelium op, waardoor weer ammoniak in de oplossing komt. Dat er proteolyse optreedt, is duidelijk te zien, de mycelia worden aan den onderkant zwart gekleurd, terwijl het gewicht afneemt, naarmate de proef langer duurt. Voor de bepaling van de theoretische kali-kurve van den stam Poschenrieder werd eerst gebruik gemaakt van de door

¹⁾ Voor de zuivering van de saccharose werd als volgt te werk gegaan:

1 kg rietsuiker werd in 250 cc kokend gedestilleerd water opgelost; de kokende oplossing werd in 2 l alcohol 96 % uitgegoten. Na afkoeling werd de geprecipiteerde suiker op een zuigfilter afgefiltreerd, nagewasschen met alcohol en daarna de alcohol met aether verdreven (niet absoluut noodzakelijk, slechts met het oog op snelle afwerking) Opbrengst bedraagt 700—800 g.

TRISCHLER aangegeven voedingsoplossing. Hierbij bleek echter, dat het maximale myceliumgewicht beduidend achterbleef bij het myceliumgewicht gevonden bij de P_2O_5 -kurve met den stam Poschenrieder, maar waarbij andere hoeveelheden Fe, Zn en Cu gebruikt waren. Door TRISCHLER wordt gebruikt 0,00015 % Cu, 0,0001 % Zn en 0,0001 % Fe als de sulfaten, terwijl bij de P_2O_5 -kurve voor den stam Poschenrieder door ons een derde van deze hoeveelheid koper gebruikt werd (0,00005 %), tweemaal zooveel zink (0,0002 %), 5 maal zooveel ijzer (0,0005 %) en bovendien 0,0001 % Mn. Werd nu deze voedingsoplossing voor de K_2O -bepalingen gebruikt, dan bleek het myceliumgewicht, vooral bij de hoge K_2O -concentraties niet onbelangrijk hoger te zijn. Zoo werd met de oplossing van TRISCHLER bij concentraties van 0,01 en 0,015 % K_2O resp. 1,97 en 2,17 g mycelium gevonden, tegen resp. 2,11 en 2,54 g met de door ons gewijzigde voedingsoplossing.

De oplossing van TRISCHLER is dus ook wat dit punt betreft niet optimaal, speciaal wat betreft het ijzergehalte, zoodat het gevaar niet denkbeeldig is, dat gronden met een hoog K_2O -gehalte, die tevens ijzerrijk zijn, hogere waarden zullen geven dan gronden met evenveel K_2O , welke ijzerarm zijn. Voor het bepalen van de K_2O -kurve voor den stam Poschenrieder werd door ons dan ook de volgende, gewijzigde voedingsoplossing gebruikt. (Opgemerkt zij nog dat een verhooging van het Fe-gehalte tot 0,001 % geen verdere mycelgewichtsvermeerdering ten gevolge had.)

10 % saccharose	0,00005 % Cu	} als sulfaten
1 % citroenzuur	0,0005 % Fe	
0,6 % $(NH_4)_2SO_4$	0,0002 % Zn	
0,1 % pepton	0,0001 % Mn	
0,075 % P_2O_5 als $(NH_4)H_2PO_4$		
0,03 % $MgSO_4$.		

De stijgende hoeveelheden K_2O werden toegevoegd in den vorm van K_2SO_4 . Ook hier werd weer gebruikt 75 cm³ voedingsoplossing in 300 cm³ erlemeyers, terwijl de bepalingen in 4 parallelproeven werden gedaan. De cultuurtijd was 4 dagen bij 37° C, geënt werd met 3 druppels entsuspensie.

De gevormde mycelia zijn tot een concentratie van 0,003 % K_2O eenigszins met sporen bedekt en vormen stevige lagen, die gemakkelijk uit de kolf zijn te krijgen. Het blijkt, dat de pH-dalingen, bij gebruik van den stam Poschenrieder, geleidelijk grooter worden naarmate er meer K_2O aan de voedingsoplossing is toegevoegd, dus naarmate er meer mycelium gevormd wordt. In tegenstelling met den stam Groningen treedt er bij den stam Poschenrieder bij de concentratie 0,015 % K_2O geen proteolyse op, hetgeen ook te zien is aan de gevonden eind-pH. Vergelijkt men de gevonden myceliumgewichten

TABEL XXVIII

K ₂ O in %	Stam Groningen			Stam Poschenrieder		
	Myceliumgewicht	Begin-pH	Eind-pH	Myceliumgewicht	Begin-pH	Eind-pH
0	0,05 ± 0,005	3,47	3,47	0,05 ± 0,005	2,39	2,46
0,0005	0,26 ± 0,011	3,43	3,43	0,18 ± 0,002	2,39	2,31
0,001	0,39 ± 0,012	3,40	3,55	0,30 ± 0,009	2,39	2,24
0,0015	0,55 ± 0,010	3,45	3,47	0,40 ± 0,011	2,39	2,16
0,002	0,65 ± 0,012	3,46	3,40	0,46 ± 0,011	2,39	2,13
0,0025	0,82 ± 0,009	3,45	3,48	0,58 ± 0,019	2,39	2,01
0,003	1,02 ± 0,047	3,51	3,54	0,69 ± 0,007	2,39	1,94
0,004	1,47 ± 0,016	3,53	3,28	0,91 ± 0,012	2,39	1,85
0,005	1,78 ± 0,029	3,47	3,12	1,14 ± 0,005	2,39	1,77
0,006	2,09 ± 0,040	3,45	2,77	1,38 ± 0,011	2,39	1,75
0,007	2,19 ± 0,040	3,50	2,84	1,57 ± 0,026	2,39	1,71
0,008	2,38 ± 0,030	3,50	2,69	1,77 ± 0,025	2,39	1,69
0,010	2,61 ± 0,040	3,52	2,69	2,11 ± 0,030	2,39	1,63
0,012	2,69 ± 0,033	3,51	3,12	2,37 ± 0,012	2,39	1,57
0,015	2,72 ± 0,036	3,53	3,10	2,54 ± 0,024	2,39	1,55

van de stammen Groningen en Poschenrieder dan blijken die van den stam Groningen bij alle concentraties K₂O hooger te zijn dan die van den stam Poschenrieder, zooals ook te zien is uit de bij deze tabel behorende grafische voorstelling.

*De verhouding van de hoeveelheid grond tot de hoeveelheid
voedingsoplossing*

Wat is voor de K₂O-bepaling de meest geschikte verhouding van de hoeveelheid toegevoegden grond en de hoeveelheid voedingsvloeistof per kolfje? Tot dusverre werd door NIKLAS en ook door BAYENS steeds genomen 2,5 g grond op 30 cm³ voedingsvloeistof. Aangezien hier steeds met 75 cm³ voedingsoplossing gewerkt wordt, zou dit dus een verhouding geven van 6,25 g grond op 75 cm³ oplossing. Om na te gaan of deze hoeveelheid ook geschikt is voor den stam Groningen, werden bij een volgende proef stijgende hoeveelheden van verschillende gronden, die wisselende hoeveelheden K₂O bevatten, aan kolfjes met 75 cm³ voedingsoplossing toegevoegd.

De berekening van de hier verkregen waarden, ten einde vergelijkbare gegevens te verkrijgen, wordt bemoeilijkt, doordat men bij het gebruik van meer grond niet alleen meer K-verbindingen toevoegt, maar ook andere factoren wijzigt.

Bij een hoeveelheid van 2,5 g grond op 75 cm³ cultuurvloeistof zal, doordat de concentratie van de K in de vloeistof kleiner is dan wanneer men 7,5 g

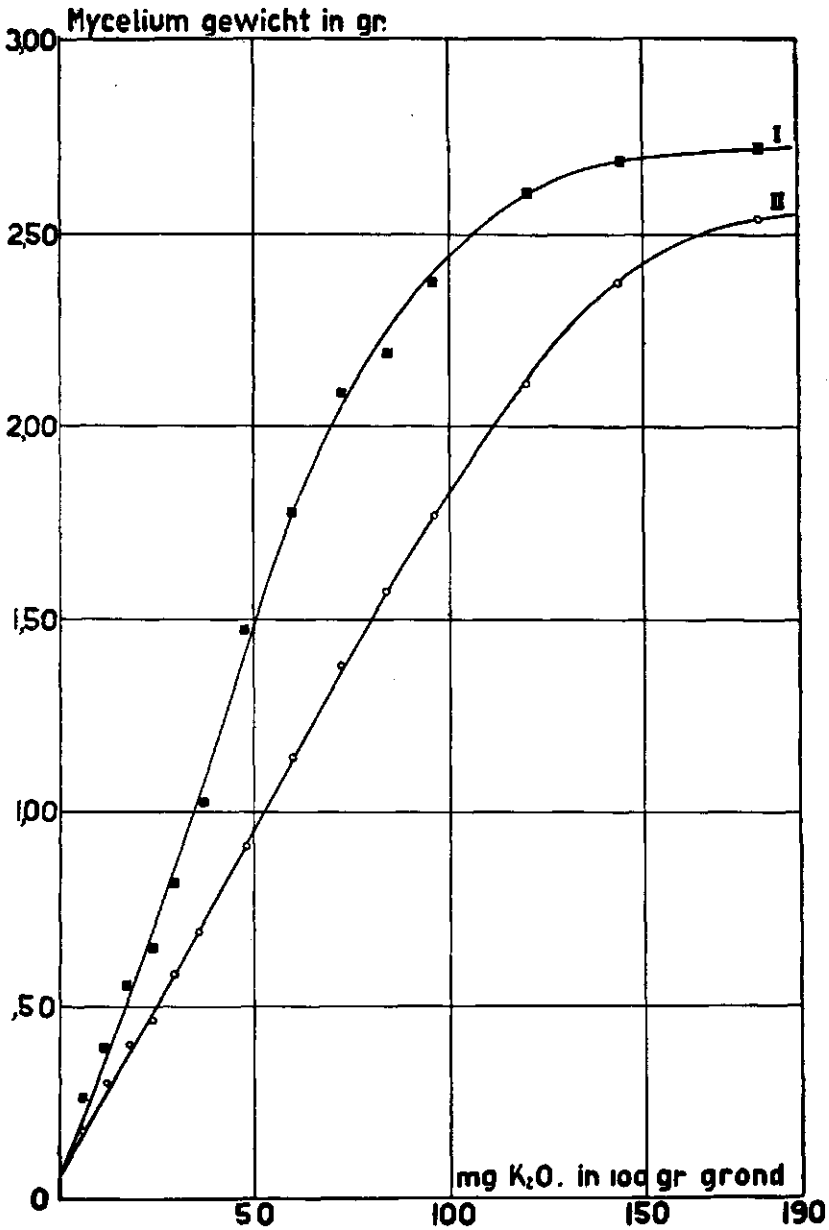


Fig. III

Het verband tusschen het mycelium-gewicht en het K_2O -gehalte van het voedingsmedium voor de *Aspergillus*-stammen Groningen (I) en Poschenrieder (II)

Aan de zuivere cultuurvloeistof werden stijgende hoeveelheden K_2SO_4 toegevoegd en de resulterende mycelgewichten bepaald.

De toegevoegde hoeveelheden K_2O werden daarna op 100 g grond omgerekend.

TABEL XXIX

N ^o . grond ¹⁾	2,5 g grond		5 g		7,5 g		10 g	
	Myc. gew.	mg K ₂ O in 100 g grond	Myc. gew.	mg K ₂ O in 100 g grond	Myc. gew.	mg K ₂ O in 100 g grond	Myc. gew.	mg K ₂ O in 100 g grond
73 178	0,38	28,1	0,57	23,1	0,77	20,8	0,95	19,4
73 256	0,44	35	0,71	29	0,96	26,3	1,26	25,6
69 185	0,32	23,8	0,50	20	0,70	18,7	0,94	19,4
F II	0,76	61,3	1,42	59,1	1,96	57,1	2,20	52,0
B II	1,10	87,6	1,91	82,5	2,33	76,6	2,53	68,7

grond neemt, naar verhouding ook meer K uit het complex naar buiten treden. Bovendien zorgt de schimmel ervoor, dat deze concentratie ook weer snel verlaagd wordt en diensgevolge zal de hoeveelheid K, die door nalevering ter beschikking van de schimmel komt groter zijn, naarmate minder grond gebruikt wordt.

Om dezelfde reden is het dus niet hetzelfde of men 2,5 g grond op 30 cm³ vloeistof neemt of op 75 cm³.

Uit de verkregen gegevens blijkt dan ook duidelijk, dat naarmate men minder grond neemt, men relatief *meer* K₂O vindt; dit is wel is waar een nadeel, doch hierin verschilt de *Aspergillus*-methode niet principieel van welke andere chemische methode ook, uitgezonderd die, waarbij het totaal K₂O door ontsluiting met sterk zuur wordt bepaald, welke bepaling echter voor de bepaling van de kalibehoeften van den grond het minste houvast geeft. Men moet dus ook hierbij een zekere afspraak maken en straks aan de hand van bemestingsproeven in het veld nagaan, in hoeverre de gevonden waarden inderdaad een indruk geven van den bemestingstoestand.

Daar er verder geen aanwijzing is waardoor een bepaalde verhouding de voorkeur zou verdienen, hebben wij ons verder gehouden aan de verhouding, zooals die ook door andere onderzoekers gebruikt wordt, nl. van 2,5 g grond op 30 cm³ vloeistof, hetgeen voor de door ons gebruikte *hoeveelheid van 75 cm³ vloeistof neerkomt op 6,25 g luchtdroge grond*, welke hoeveelheid dan ook in al deze hier volgende bepalingen is aangehouden.

Dat wij echter meer grond en grotere kolven gebruiken vindt zijn oorzaak in het feit, dat wij op deze wijze ongeveer twee maal zooveel mycelium oogsten en de systematische fouten, die bij een dergelijke biologische bepaling onvermijdelijk zijn, tot een minimum terug brengen.

¹⁾ Stam Groningen. Cultuurtijd 4 dagen bij 37° C. Geënt met 3 druppels entsuspensie. Het myceliumgewicht is het gemiddelde van 3 bepalingen.

De berekening geschiedde als volgt: Aan de hand van de K_2O -kurve, verkregen met de zuivere cultuurvloeistof, wordt nagegaan met hoeveel mg K_2O het met a g grond gevonden myceliumgewicht overeenkomt, de gevonden waarde wordt door vermenigvuldiging met $\frac{100}{a}$ op 100 g grond omgerekend.

Nadat was vastgesteld, dat in het vervolg met 6,25 g grond op 75 cm³ cultuuroplossing zou worden gewerkt, leek het practisch om uit de 1e curve een tweede af te leiden, waarbij men bij een bepaald myceliumgewicht direct de hoeveelheid K_2O in mg op 100 g grond kan aflezen.

III. Kalibemestingsproeven bij enkele grondmonsters

Om na te gaan in hoeverre een kalibemesting van een grond met de Aspergillus-methode kon worden teruggevonden, werd een proef aangezet waarbij aan de voedingsoplossing, waaraan al 6,25 g grond als kalibron was toegevoegd, nog een extra kalibemesting gegeven werd. Van de gebruikte zandige gronden is niet te verwachten, dat zij de kali in belangrijke mate zullen vastleggen.

Als kalibemesting werd genomen een 40 % kalizout. Hiervan werd gemaakt een oplossing van 25 g in 1 l H_2O . (Analyse van 20 cm³ van deze oplossing 0,1846 g K_2O . Per liter bevat deze kalizoutoplossing dus 9,23 g K_2O .) Van deze oplossing werd weer een verdunning gemaakt en wel één die 162,5 cm³ bevat aangevuld tot 1 l. Wordt van deze oplossing per kolfje van 75 cm³ voedingsvloeistof 0,5 cm³ toegevoegd, dan komt deze kalibemesting overeen met 0,001 % K_2O (met betrekking tot de cultuurvloeistof). Als kalibemesting werd genomen 0; 0,001; 0,002; 0,003 en 0,005% K_2O .

TABEL XXXa

Grondsoort	Monster N°.	Myceliumgewicht bij bemesting van K_2O in %				
		0	0,001	0,002	0,003	0,005
Eschgrond (zand) met 6,2 % humus en pH 5,1 Winterswijk.	73 178	0,59	0,98	1,30	1,81	2,21
Humush. zandgrond met 5,3 % humus en pH 5,4, Aalten (Lintelo)	73 256	0,79	1,25	1,57	1,97	2,47
Lichte zandgrond met 4,4 % humus uit Dinxperlo	69 512	0,99	1,41	1,74	2,08	2,53
Humusarme zandgrond, pH 4,5. Ontginning Hooghalen . . .	B II	2,02	2,20	2,41	2,50	2,80

Cultuurtijd 4 dagen bij 37° C. Stam Groningen. Geënt met 3 dr. suspensie. Genomen 6,25 g grond per kolfje. Het myceliumgewicht is het gemiddelde van 3 bepalingen.

De kalibemesting heeft, vóór de proef, 10 dagen op de afgewogen hoeveelheden grond ingewerkt om een wisselwerking tusschen den grond en het toegevoegde kali-zout mogelijk te maken. Uit deze tabel is te zien, dat zelfs bij een grond met hoog K_2O -gehalte, bemesting met kali zich nog duidelijk in een hooger myceliumgewicht afspiegelt. Nog duidelijker is dit te zien, wanneer men met behulp van de theoretische kali-curve de gevonden myceliumgewichten omrekent op het aantal mg K_2O in 100 g grond, zooals uit de volgende tabel blijkt.

TABEL XXXb

Grond N°.	mg K_2O in 100 g grond bij bemesting K_2O in %				
	0	0,001	0,002	0,003	0,005
73 178	19	32	42,5	61,5	83,5
73 256	25,5	40,5	52	69	103,5
69 512	32,5	46	58,6	75	110
B II	71,5	83	98,5	107	150

De hier gegeven getallen geven dus aan het aantal mg K_2O dat 100 g grond na de verschillende bemestingen bevat. Deze bemestingen bedragen omgerekend op 100 g grond 12 mg, 24 mg, 36 mg en 60 mg K_2O . De teruggevonden hoeveelheid K_2O van de bemesting kan berekend worden door het oorspronkelijke kali-gehalte af te trekken van het na de bemesting gevonden kali-getal. Op deze manier zijn de volgende getallen gevonden:

TABEL XXXc

Grond N°.	Aantal mg K_2O teruggevonden bij bemesting van 100 g grond met mg K_2O			
	12	24	36	60
73 178	13	23,5	42,5	64,5
73 256	15	26,5	43,5	78
69 512	13,5	26	42,5	77,5
B II	11,5	27	35,5	78,5

Hieruit is dus te zien, dat de bemesting in zijn geheel teruggevonden wordt, bij de hoogere bemestingen zelfs te veel. De bij de bemestingen met 36 en 60 mg gevonden afwijkende waarden kunnen gedeeltelijk veroorzaakt worden, doordat de hier gevormde mycelia een zóó hoog drooggewicht hebben, dat de aflezingen

minder nauwkeurig worden, omdat deze plaats in of voorbij de bocht in de kali-kurve ligt. Uit deze proef kan men dus besluiten, dat bij gronden met kaligebrek en met middelmatig kaligehalte het afgelezen aantal mg K_2O in 100 g grond in het algemeen betrouwbare waarden geeft. Eenigszins minder nauwkeurige waarden zijn te verwachten bij overbemeste gronden, dus bij gronden die een myceliumgewicht geven, dat op de kali-kurve in of boven de bocht ligt. De gevonden kali-getallen zijn echter voldoende nauwkeurig om voor de praktijk te kunnen vaststellen in hoeverre de kalivoorraad in den grond groot of klein is.

Voor het geval beslist grotere nauwkeurigheid gewenscht is, zou men de proeven in deze uitzonderlijke gevallen met minder grond kunnen overdoen; de aldus verkregen cijfers zijn echter niet geheel met de andere te vergelijken, omdat op die wijze relatief meer K-verbindingen aan den grond worden onttrokken.

Het was tevens wenschelijk eens na te gaan, in hoeverre een kalibemestingsproef uit de praktijk zich in de gevonden myceelgewichten zou afteekenen.

Tevens was het de bedoeling van deze proef om te zien in hoeverre de in verschillende monsters van eenzelfde proefveldje met behulp van de Aspergillus-methode gevonden kaliwaarden met elkander overeenstemden. Voor dit onderzoek werden de gronden genomen, welke deel uitmaakten van een met zorg opgezette kali-kalk bemestingsproef (Pr 80) op de Proefboerderij te Nw. Beerta.

Van elk veldje werden drie mengmonsters genomen van telkens 4 steken op verschillende plaatsen.

De jaarlijksche bemesting was als volgt:

A	500 K_2O + CaO
B	150 K_2O + CaO
C	0 K_2O + CaO
D	500 K_2O
E	150 K_2O
F	0 K_2O

Uit tabel XXXI blijkt dus, dat de monsters van verschillende plaatsen van een en 't zelfde veldje uitstekend overeenstemmende myceliumgewichten geven. De gegeven kalibemesting teekent zich duidelijk af in de gevonden myceliumgewichten, niettegenstaande de onbemeste veldjes al een vrij groote hoeveelheid kali bevatten. Van eenigen invloed van het CaO op het gevormde mycelium is niets te merken, hetgeen ook voor de K-bepaling het groote voordeel bewijst van de toevoeging van Ca-citraat aan onze cultuurvloei-stof.

TABEL XXXI

Met bekalking				Zonder bekalking			
Monster N°.	Myc. gew.	Begin-pH	Eind-pH	Monster N°.	Myc. gew.	Begin-pH	Eind-pH
A I	2,64	2,65	3,67	D I	2,74	2,74	3,69
A II	2,68		2,94	D II	2,75		3,62
A III	2,63		3,07	D III	2,72		3,03
B I	2,22	2,14	3,67	E I	2,17	2,10	3,62
B II	2,08		3,02	E II	2,05		3,00
B III	2,13		3,02	E III	2,08		3,00
C I	1,75	1,60	3,69	F I	1,44	1,60	3,62
C II	1,51		3,34	F II	1,69		3,36
C III	1,53		3,34	F III	1,68		3,41

Stam Groningen. Voedingsoplossing Groningen. Cultuurtijd 4 dagen bij 37° C. Geënt met entsuspensie. Per kolfje is toegevoegd 6,25 g grond.

IV. Vergelijking van de K₂O-getallen in grond met de stammen Groningen en Poschenrieder en ook met Neubauer- en zoutzuuroplosbaar getallen

Vergelijking van de stammen Groningen en Poschenrieder

Met behulp van de stammen Groningen en Poschenrieder werd in ± 30 grondmonsters het K₂O-gehalte bepaald. Als grondmonsters werden hier, evenals bij het P₂O₅-onderzoek, verschillende grondtypen gekozen als: zandgrond, humushoudende zandgrond, zavel- en kleigronden. Sommige van deze grondmonsters zijn van proefvelden, die met stijgende hoeveelheid kali bemest zijn. Ook werden in eenige kalkhoudende gronden K₂O-bepalingen gedaan. De in den grond aanwezige kalk werd volgens SCHEIBLER bepaald en met de berekende hoeveelheid citroenzuur geneutraliseerd.

Bij de bepalingen werden telkens 6,25 g luchtdroge grond per kolfje toegevoegd, terwijl de begin-pH bepaald werd in een extra kolfje. De verkregen myceliumgewichten en de zuurgraadsveranderingen van de voedingsoplossing zijn samengevat in tabel XXXII, terwijl een korte beschrijving van de grondmonsters in tabel XXXIII te vinden is. Over het algemeen was de groei van beide stammen uitstekend, er trad slechts in een enkel geval infectie met *Penicillium* op. Het drooggewicht van het gevormde mycelium was bij den stam Poschenrieder steeds lager dan bij den stam Groningen.

Gaat men nu de pH-veranderingen na, dan blijkt de begin-pH bij den

stam Groningen te varieeren van 3,74 tot 3,35 en de eind-pH van 3,52 tot 2,91. Deze waarden wijken slechts weinig af van de pH-getallen, die gevonden zijn bij de theoretische K_2O -kurve. Een vergelijking met deze kurve zal dus geen bezwaren opleveren, aangezien de schimmel onder analoge omstandigheden gegroeid is.

Bij het bepalen van de theoretische kurve voor den stam Poschenrieder is de begin-pH steeds $\pm 2,4$, terwijl de eind-pH met toenemend K_2O -gehalte daalt van 2,46 tot 1,55. Wanneer dus door toevoeging van grond de begin-pH varieert tusschen 2,62 en 3,71 al naar gelang van het kalkgehalte en de eind-pH tusschen 2,11 en 3,49 schommelt, zullen de omstandigheden waaronder de schimmel zich ontwikkelt in meerdere opzichten van die van de K_2O -kurve afwijken. Het is dus zeer wel mogelijk, dat bij vergelijking van het myceliumgewicht met dat van de theoretische kurve er fouten optreden in de afgelezen mg K_2O . Het is dan ook te verwachten, dat bij de kalibepalingen de met den stam Groningen verkregen omgerekende, K_2O -getallen nauwkeuriger zijn dan die, met den stam Poschenrieder verkregen.

Vergelijking van de Aspergillus-getallen met de Neubauer- en de K-HCl-getallen

Evenals bij het fosphaatonderzoek werd bij het kalionderzoek de Aspergillus-methode in een beperkt aantal gevallen vergeleken met de verschillende in de praktijk toegepaste methoden en wel met de Neubauer-methode en de oplosbaarheid in 0,1 N HCl.

De in tabel XXXIII staande getallen voor de Aspergillus-methode geven aan het aantal mg K_2O in 100 g luchtdrogen grond en zijn uit de in tabel XXXII staande myceliumgewichten verkregen met behulp van de kali-kurve.

De Neubauer-getallen geven ook het aantal mg K_2O in 100 g grond, het symbool K-HCl geeft aan het percentage K_2O dat vastgesteld wordt in den grond na extractie met 10 deelen 0,1 N HCl.

Het kali-getal is een maatstaf voor de verzadiging van het humuscomplex met kali en wordt alleen bij zandige gronden bepaald. Hierbij wordt een hoeveelheid grond, die 6,25 g humus bevat, met 0,1 n zoutzuur geëxtraheerd. Voor kleigronden bepaalt men eenvoudig de hoeveelheid K_2O , die uit een bepaalde hoeveelheid grond met verdund zoutzuur kan worden opgelost.

Voor het onderzoek waren ook hier weer verschillende grondtypen gekozen, zooals zandgrond en kleigronden, terwijl ook humushoudende en kalkhoudende gronden onderzocht zijn. De over de verschillende grondmonsters bekende gegevens zijn alle samengevat in tabel XXXIII. Verschillende van deze grondmonsters zijn van proefveldjes, die met stijgende hoeveelheden kali bemest zijn en waarvan ook de vroegere bemestingsgegevens bekend zijn.

TABEL XXXII

N°. grond	Stam Groningen			Stam Poschenrieder		
	Myc. gewicht	Begin- pH	Eind- pH	Myc. gewicht	Begin- pH	Eind- pH
73147	0,53	3,57	3,52	0,31	2,91	2,79
73146	0,50	3,62	3,47	0,35	2,95	2,69
73153	0,55	3,62	3,50	0,36	2,91	2,39
73152	0,61	3,62	3,52	0,34	2,98	2,50
73155	0,47	3,61	3,52	0,32	2,95	2,54
73154	0,59	3,61	3,52	0,37	3,02	2,54
73145	0,67	3,61	3,52	0,41	2,98	2,54
74144	0,80	3,61	3,48	0,42	3,08	2,44
71939	2,70	3,62	2,91	2,00	3,15	2,41
71940	2,00	3,61	3,12	1,23	3,06	2,46
71941	1,51	3,63	3,29	0,98	3,04	2,62
53855	0,33	3,55	3,43	0,21	2,84	2,39
53854	0,47	3,55	3,48	0,33	2,90	2,39
53852	0,67	3,57	3,52	0,43	2,82	2,31
53851	0,86	3,61	3,47	0,51	2,85	2,29
63193	0,48	3,59	3,50	0,37	2,91	2,35
63195	0,87	3,61	3,48	0,73	2,90	2,11
63192	0,76	—	3,50	—	—	—
Nieuwland- polder	2,08	3,45	3,33	1,19	3,22	3,20
Oostw.polder	2,39	3,64	3,24	1,34	3,71	3,49
Reiderw.pold.	2,32	3,41	3,19	1,39	3,69	3,34
60021	0,41	3,49	3,39	0,35	2,96	2,90
63851	0,36	3,53	3,46	0,32	2,94	2,82
69350	0,47	3,49	3,41	0,44	2,94	2,82
66375	0,69	3,74	3,43	0,46	3,62	3,24
68905	0,35	3,37	3,17	0,38	2,94	2,99
61759	0,30	3,53	3,42	0,29	2,65	2,99
61848	0,31	3,37	3,32	0,27	2,65	2,96
51627	0,39	3,35	3,22	0,47	2,94	2,50
75219	0,43	3,40	3,16	0,40	2,63	2,51
44314	0,31	3,45	3,24	0,24	2,63	2,65

Cultuurtijd 4 dagen bij 37° C. Geënt met 3 druppels entsuspensie. Het myceliumgewicht is het gemiddelde van 3 bepalingen. Per kolfje werd 6,25 g grond gevoegd als kaliumbron. Een korte opgave van de plaats van herkomst, bemesting, klei, humus en kalkgehalte dezer grondmonsters vindt men in tabel XXXIII.

Uit tabel XXXIII is te zien, dat een stijgende kalibemesting vrijwel altijd stijgende kali-getallen geeft, onverschillig welke methode gebruikt wordt.

Ook vindt men steeds bij kaligebrek volgens alle methoden lage kali-getallen en omgekeerd bij hoog kaligehalte van den grond hoge getallen. Vergelijkt men de getallen gevonden met de *Aspergillus*-stammen Groningen en Poschenrieder, dan blijkt de stam Poschenrieder over het algemeen bij laag K₂O-gehalte van den grond hogere kaligetallen te geven dan de stam Groningen. Dit is vooral het geval bij gronden met veel humus (N°. 63195,

TABEL XXXIII

Perceelnummer	Grondsoort	Bemesting	Num- mer	Humus in %	Klei in %	CaCO ₃ in %	Neu- bauer K ₂ O	K HCl mg K ₂ O op 100 g grond	K-getal	Aspergillus mg K ₂ O/100 g grond	
										Gron.	Posch.
Pr 172 Eenrum	zavelgrond	0 K	73147	2,8	17,8	0,04	13,3	9	—	17	13
		50 "	73146	—	—	—	13,8	9,5	—	16	15
		100 "	73153	—	—	—	14,7	9,5	—	17,5	15,5
		150 "	73152	—	—	—	16,4	11,5	—	19,5	14,5
		0 K	73155	—	—	—	14,1	8,5	—	15	13,5
Pr 80 Nw. Beerta	kleigrond	200 "	73154	—	—	—	18,3	10,5	—	19	16,5
		250 "	73145	—	—	—	21,2	1,3	—	21,5	19
		300 "	73144	—	—	—	29,0	16,5	—	26	19
		kalk 0 K	71941	3,6	71,5	0,09	—	23	—	49,5	49,5
0051 Markelo	eschgrond	150 "	71940	3,6	—	0,09	—	39	—	70,5	64,5
		500 "	71939	3,6	—	0,07	—	68	—	> 140	112
		100 P 0 K	53855	6,7	9,2	—	2,5	—	11	9,5	8,5
		100 "	53854	6,7	—	—	6,7	—	20	15	14
0063 de Krim	humusrijke dalgrond	160 "	53852	6,9	—	—	—	—	29	21,5	19,5
		240 "	53851	7,2	—	—	20,3	—	36	27,5	24
		60/ 40 K	63193	16,6	—	—	7,4	—	12	15	16
		120/ 80 "	63197	17,6	—	—	15,1	—	14	—	—
Pr 171 Hornhuizen	lichte zavelgrond	180/120 "	63195	20,2	—	—	—	—	17	28	35,5
		240/180 "	63192	17,3	—	—	31,4	—	23	24,5	—
Pr 295	lichte	onbemest	69021	2,8	16	—	—	8	—	12,5	15
		—	69350	12,3	18	0,02	—	10	—	15	20

nr. schuilen Hoorn	zwarte zavelgrond	8 j. onbe- mest	66375	5	27	3,1	—	11	—	22,5	21
0051 Markelo	eschgrond	8 j. onbe- mest	68905	6,7	9,2	—	—	—	13	10,5	17
WO. 105 Willemsoord	zandgrond grond	4 j. onbe- mest	61759	6,3	10,9	—	—	—	11	9	12
PO. 1 Heino	eschgrond	stalmest	61848	6	4,8	—	—	—	13	9,5	11
O.F. 9 Jubbega	zandgr. grasland	5 j. geen K	51627	13,7	—	—	—	—	11	12	22
Pr 100 Emmercomp.	nieuwe dalgrond	6 j. geen K	75219	6,1	3,2	—	—	—	10	13,5	18
Z. Gr. 2 Borgercomp.	oude dalgr.	7 j. geen K	44314	12,2	4,9	—	—	—	7	9,5	10
WO. 119 Dedemavaart	oude dalgr.	7 j. geen K	63815	10,9	3,0	—	—	—	11	10,5	13,5
Nieuwl. polder	kleigrond	—	—	2,8	77,7	1,38	—	—	—	75	62
Oostwolderpolder	kleigrond	—	—	2,6	72,9	4,5	—	—	—	97	70,5
Reiterw. polder	kleigrond	—	—	2,4	53,5	8,43	—	—	—	91	73,5

¹⁾ 1 eenheid K getal = 0,09 mg K₂O op 1000 mg humus.

De cijfers van het K-getal en de K-HCl werden door het Bedrijfslaboratorium voor Grondonderzoek bepaald, evenals de humus, klei en CaCO₃ percentages.

69550, 51627). Bij gronden met hoog kaligehalte daarentegen vindt men met den stam Groningen hoogere K_2O -getallen.

Dit zelfde verschijnsel werd ook gevonden bij de fosphaatbepalingen. Een verklaring hiervan zou men kunnen vinden in het feit, dat de voor den stam Groningen gekozen voedingsoplossing zoo optimaal mogelijk is, terwijl zooveel mogelijk getracht is om de factoren, die in den grond aanwezig zijn (behalve kali en fosphaat) en die den groei van *Aspergillus* zouden kunnen bevorderen, uit te schakelen door deze reeds aan de voedingsoplossing toe te voegen. Gaat men bv. uit van een grond met een laag kali-getal, dan is het mogelijk dat deze grond nog stoffen bevat, bv. humuszuur of calcium, die stimuleerend werken op den groei van de schimmel. Werkt men nu met den stam Poschenrieder, dan zal het mogelijk zijn dat men een grootere hoeveelheid mycelium vindt, dan met het erin aanwezige kaligehalte overeenstemt. Bij aflezing op de kurve vindt men dan een te hoog kali-getal. Aangezien zowel humuszuur als calcium aan de voedingsoplossing voor den stam Groningen worden toegevoegd, wordt in dit geval deze fout uitgeschakeld, waardoor het te verwachten is, dat met den stam Groningen nauwkeuriger kali-getallen verkregen worden.

Het vinden van hoogere K_2O -getallen met den stam Groningen bij gronden, die groote hoeveelheden K_2O bevatten, kan men verklaren uit het constant blijven van de begin- en eind-pH van de voedingsoplossing, waardoor dus ook tijdens de geheele ontwikkeling van het mycelium de zuurgraad optimaal blijft voor den groei van *Aspergillus*. Bij den stam Poschenrieder en de voedingsoplossing van TRISCHLER verschillen deze begin- en eind-pH vrij sterk. Ook ontstaat er door toevoeging van grond aan deze voedingsoplossing een vrij groote pH-verandering. De factoren, die de vorming van het mycelium beïnvloeden veranderen dus, waardoor vergelijking van de gevonden myceliumgewichten en omrekening tot de kali-getallen met de K_2O -kurve minder betrouwbare resultaten zal geven dan dit met den stam Groningen het geval is.

De fout, welke aan de kali-bepalingen kleeft, bedraagt 2,5—3 % en is alleen bij het begin van de kromme iets hoger.

De reproduceerbaarheid der *Aspergillus*-bepalingen nadert dan ook die der chemische bepaling en is belangrijk beter dan die der Neubauer-bepalingen.

Waardeering der gevonden K-Aspergillus-cijfers in verband met de proefveld-resultaten

Om redenen reeds bij de fosphaatbepaling vermeld, was het wenschelijk ook bij de K-bepalingen na te gaan, in hoeverre de gevonden K-getallen (Stam

Groningen) met de beoordeeling, op grond van bemestingsproeven, overeenstemmen.

Bijzonderheden over den grond	Bemesting	Bemestingsresultaten	Beoordeeling	K-Aspergillus Gr.
No OO 51, Markelo, eschgrond met 7 % humus en 9,2 % afslibbare deelen	0	Meer opbrengst bij aardappelen 62 % met 100 K ₂ O, 64 % met 160 en 78 % met 240. K ₂ O. Doordat met stijgende kaligift het zetmeelgehalte daalt, wordt een bemesting met 100 K ₂ O voldoende geacht	Deze eschgrond is zeer kali-armen moet flink bemest worden	9,5
	160	—	Kalitoestand in orde	21,5
	240	—	Kalitoestand ruim	27,5
Pr OO 63, De Krim, dalgrond met 16—20 % humus	60	Een nul-object ontbreekt; verhooging van de bemesting van 60 op 180 doet echter de aardappel-opbrengst nog met 20 % stijgen, het zetmeelgehalte bovendien nog met 11,5 %	Kalitoestand onvoldoende	15
	180	—	Kalitoestand voldoende	28
	240	—	Kalitoestand ruim	24,5
WO 105, Willemsoord, zandgrond met 6,3 % humus en 10,7 % afslibbare deelen	4 jaar onbemest	Rogge brengt door bemesting 5 % meer op, aardappelen 12 %, erwten 20 %	Deze grond vertoont vrij sterk kaligebrek	9
PO 1, Heino, eschgrond met 6 % humus, 4,8 % afslibbare deelen	6 j. geen K	Hier brengen knollen 13 % meer op door bemesting met kali, haver 25 % en rogge 30 %	Ook hier dient een flinke bemesting te worden gegeven	9,5
OO 51 Markelo, zie boven	8 j. onbemest	Als boven	Zeër kali-arme grond	10,5
Pr 100, Emmercompasuum, nieuwe dalgrond met 6,1 % humus en 3,2 % afslibbare deelen	6 j. geen kali	Tarwe bracht door bemesting 150 % meer op, aardappelen 300 %	Zeër sterk kaligebrek	13,5

Bijzonderheden over den grond	Be- mesting	Bemestingsresultaten	Beoordeeling	K- Asper- gillus Gr.
ZGr 2, Borgercompagnie, oude dalgrond met 12,2 % humus en 4,9 % afslibbare deelen	7 j. geen kali	De tarwe-opbrengst steeg door bemesting met 125 %, de aardappelopbrengst met 183 %	Zeer sterk kaligebrek	9,5
WO 119, Dedemsvaart, oude dalgrond met 10,7 % humus en 3 % afslibbare deelen	7 j. geen kali	Zomertarwe bracht door kalibemesting 40 % meer op, aardappelen 70 %	Sterk kaligebrek, flinke bemesting noodig	10,5
Pr 172, Eenrum, zavelgrond met 2,8 % humus en 18 % afslibbare deelen	Geen bemesting	Wintertarwe bracht door K-bemesting met 100 kg K ₂ O 15 % meer op, erwten reageerden sterker en brengen resp. 37, 39 en 50 % meer op bij bemestingen met resp. 200, 250 en 300 kg —	Deze zavelgrond is sterk kali-arm en moet zwaar bemest worden	17
	Geen bemesting	—	Idem	15
Pr 171, Hornhuizen, lichte zavel met 2,8 % humus en 16 % afslibbare deelen	Geen bemesting	Hier reageerden alle gewassen sterk op kalibemesting; erwten leverden 75 % meer op, wintertarwe 25 %	Sterk kaligebrek	12,5
Pr 295, Kloosterburen, lichte, humushoudende zavel met 12,3 % humus en 18 % afslibbare deelen	Geen bemesting	Op dezen grond bracht rogge 10 % meer op door kalibemesting, haver reageerde niet	Normale bemesting aan te bevelen	15
Hoorn, Schooltuin, zware zavel met 5 % humus en 27 % afslibbare deelen	8 j. onbemest	Hier brachten aardappelen door bemesting 12 % meer op	Normale bemesting aan te bevelen	22,5
Jubbega (Fr.), grasland op zavelgrond met 13,7 % humus (zodelaag van 0—5 cm)	5 j. geen kali	De 1ste snee gras steeg door bemesting met 70 %, de 2de met 20 %. In 1935 werd door K-bemesting 80—90 % meer gras geoogst	Zeer sterk K-gebrek op grasland	11

Bijzonderheden over den grond	Be- mesting	Bemestingsresultaten	Beoordeeling	K- Asper- gillus Gr.
Pr 80, Nw.-Beerta, ontkalkte, zware kleigrond met 3,6% humus en 71% klei	0	Op dezen grond re- ageerden karwij, ha- ver en tarwe niet op K-bemesting; winter- gerst bracht 3% meer op met 150 en 7 % met 500 kg, erwten resp. 8 en 10% meer	Normale bemesting aan te bevelen	49,5
	150	—	Verdere bemesting overbodig	70,5
	500	—	De grond bevat een duidelijken kalivoor- raad	140
Nieuwlandpolder, zware klei (77,3 %) met 1,4 % CaCO_3	Nimmer met kali bemest	Deze polder dateert van 1701 en op dezen grond is zelfs na een paar eeuwen van K- gebrek nog geen sprake	Bevat nog een behoor- lijken voorraad kali	75
Oostwolderpolder, zware klei (72,9%) met 4,5 % CaCO_3	Als boven	Deze polder dateert van 1769. Als boven	De grond bevat een finken voorraad kali	97
Reiderwolderpolder, lichtere, kalkrijke klei met 53,5% klei en 8,4 % CaCO_3	Als boven	Dit is een jonge polder van 1865, waar in de eerstvolgende eeuwen geen kalibehoeftte te verwachten is	De grond bevat een zeer grooten kali- voorraad	91

Ook hier is het aantal onderzochte grondmonsters veel te gering, om zelfs maar voorloopige grenzen te kunnen vaststellen; wel is het duidelijk, dat men ook bij de kali-bepaling onderscheid moet maken tusschen zand- en dalgronden eenerzijds en klei- en zavelgronden anderzijds. Hier liggen echter, in tegenstelling met de fosphaatbepalingen, voor de zwaardere gronden de grenswaarden hooger dan voor de lichtere.

Op zand- en dalgronden werd een sterk kali-gebrek geconstateerd bij K-Aspergillus-getallen van 9,5; 12,5; 10,5; 9; 9,5; 11; 13,5; 9,5; 10,5.

Minder zware bemesting was aan te bevelen bij 15; 15; 22,5.

Normale bemesting noodig bij 21,5; 27,5; 28; 24,5.

Op grond van deze cijfers zou men geneigd zijn om bij K-Aspergillus-getallen beneden 14 een zware K-bemesting noodzakelijk te achten op dergelijke

zand- en dalgronden. Ook zijn er aanwijzingen, dat boven 25 met een matige bemesting in het algemeen wel zal kunnen worden volstaan.

Wat de klei- en zavelgronden betreft, is het aantal der onderzochte gronden nog kleiner, zoodat hier conclusies zeker voorbarig zouden zijn.

Wij zien, dat bij K-Aspergillus-getallen van 15 en 17,5 sterk K-gebrek kan optreden, terwijl zelfs bij 47,5 een matige bemesting soms nog wel eenig voordeel kan opbrengen. Speciaal erwten en aardappelen blijken nog te reageeren, als de graangewassen geen meeropbrengsten meer leveren. Grootere kalivoorraden in den grond zijn blijkbaar reeds boven 75 te verwachten; het is echter waarschijnlijk, dat de gevonden Aspergillus-waarden niet den geheelen reserve-kalivoorraad aanduiden, doch slechts het direct assimileerbare, terwijl het grootste deel dezer voorraden nog in de mineralen besloten zit.

Wat betreft de vergelijking met de andere methoden spreekt het van zelf, dat de hier verkregen gegevens slechts voor orienteering dienst kunnen doen. De kalibepalingen volgens NEUBAUER komen in een aantal gevallen niet alleen wat de tendens, maar zelfs in absolute grootte, vrij goed met die van de Aspergillus-methode overeen; de K-HCl-cijfers zijn doorgaans iets lager, waarschijnlijk doordat Aspergillus eenige nalevering in de hand werkt. Het is opmerkelijk, dat de K-getallen, welke toch op humus berekend zijn en niet op grond, zooals de Aspergillus-cijfers, met deze laatste in een aantal gevallen zoo'n groote overeenkomst vertoonen.

Alhoewel men ook hier tot vaststaande conclusies slechts zou kunnen komen aan de hand van een veel uitgebreider, statistisch bewerkt cijfermateriaal, dat aan bemestingsresultaten in de praktijk getoetst is geworden¹⁾, komt het ons toch voor dat de hier verkregen resultaten hoopvol stemmen, te meer omdat het vrijwel zeker is, dat de Aspergillus-methode ons in staat kan stellen een veel grooter aantal kalibepalingen met minder onkosten te verrichten, dan volgens de chemische methode mogelijk is.

Schatting van den aan de bepaling verbonden tijd en kosten

Gezien het feit, dat wij beschikken over vrij nauwkeurige chemische methoden om de P- en K-behoefte van den grond te bepalen, zal bij de beoordeeling van de bruikbaarheid der microbiologische methode niet alleen de nauwkeurigheid en het eventueele verband met de oogstopbrengsten den doorslag geven, doch zullen tevens de aan de bepaling verbonden tijd en kosten in aanmerking genomen moeten worden.

Op grond van de in ons laboratorium opgedane ervaringen en in aan-

¹⁾ Een dergelijk onderzoek is ook voor de kalibepalingen in bewerking.

sluiting met een aantal gegevens, welke ons door het Bedrijfslaboratorium voor Grondonderzoek verstrekt zijn, komen wij tot de volgende berekeningen.

Uitgaande van de veronderstelling dat in een week 1000 grondmonsters op kalibehoefte moeten worden onderzocht, en rekening houdende met een groeiperiode voor den schimmel van 4 dagen, terwijl op Zondag en een halven dag in de week niet aan deze analyses gewerkt kan worden, kunnen wij de volgende werkverdeling opmaken.

Er wordt per week 5 dagen gewerkt, te weten: Maandag, Dinsdag, Woensdagmiddag, Donderdagmorgen, Vrijdag en Zaterdag den geheelen dag. Woensdagmorgen worden nl. geen cultures ingezet, daar deze op den Zondag zouden moeten worden afgebroken; Donderdagmiddag zijn er geen cultures te verwerken, daar er 's Zondags geen zijn ingezet.

Per dag moeten dus 200 grondmonsters worden verwerkt in triplo. De gang van het onderzoek is de volgende: 's morgens worden de grondmonsters in de kolfjes gewogen, de cultuurvloeistof erbij gedaan, zoodat ze vóór 13 uur in de thermostaten staan.

's Middags worden de 4 dagen oude, volgroeide, cultures uit de thermostaten gehaald en met wat formaline tot den volgenden morgen weggezet. Den volgenden morgen worden deze mycelia gespoeld en op de filters gebracht, die den vorigen dag gedroogd en gewogen zijn. Deze natte mycelia komen tegen 12 uur in de droogstoof, waar zij 24 uur blijven. De mycelia worden 's middags gewogen.

Verder moet de cultuurvloeistof bereid worden, de suiker omgekristalliseerd, terwijl dagelijks 600 kolfjes en trechters gespoeld moeten worden.

Dit werk is op de volgende wijze over 7 meisjes A—G te verdeelen:

's Morgens

- I. Het afwegen van de monsters, invullen in de erlenmeyers. De drie meisjes A, B en C een geheelen morgen.
- II. Het automatisch vullen van de erlenmeyers met de vloeistof, welke reeds geënt is. Meisje D 2 uur. Ca-citraat in pastilles toe te voegen.
- III. Het wegzetten in de thermostaten en omwisselen van te drogen mycelia van 55° op 105° C. Meisje D 1½ uur.
- IV. Het verwerken, afspoelen en op de filters brengen van de mycelia, die den vorigen dag met formaline bedeed zijn. 3 meisjes E, F en G den geheelen morgen.

's Middags

- V. De gereed gekomen cultures uit de thermostaten halen en het toevoegen van de formaline. Meisje G 2 uur.

- VI. De 's morgens afgewerkte natte mycelia in de droogstoof zetten. Meisje C 1 uur.
 - VII. De droge mycelia uit de droogstoof halen. Meisje D 1 uur.
 - VIII. De gedroogde mycelia wegen. Meisjes E en F $1\frac{1}{2}$ uur.
 - IX. De gedroogde filters wegen. Meisjes E en F $1\frac{1}{2}$ uur.
 - X. Spoelen van het glaswerk. Meisjes A en B den geheelen middag.
 - XI. Het maken van de cultuurvloeistof en de entcultures. Meisje C twee uur.
- G en D hebben dagelijks nog in totaal 3 werkuren over, als gerekend wordt op werkdagen van $6\frac{1}{2}$ uur.

Duur eener bepaling

Voor het gereed maken van de cultures een halve dag.

Ontwikkelingstijd voor het mycelium 4 dagen. Met formaline staan $\frac{1}{2}$ dag: spoelen en drogen $1\frac{1}{2}$ dag. Wegen $\frac{1}{2}$ dag. In totaal juist een week.

Benodigde chemicaliën

Per dag is noodig $600 \times 75 \text{ cm}^3$ cultuurvloeistof = 45 l. In een werkweek van 5 dagen alzoo 225 l. Met het oog op de cultuurvloeistof benodigd voor de enting is te rekenen op 250 l gedistilleerd water, benevens :

25 kg zuivere = 31 kg gewone suiker (accijnsvrij)
 2,5 kg citroenzuur
 1 kg ureum
 4,2 kg Ca-citraat
 0,5 kg Amm. fosphaat
 0,125 kg Magnesium sulfaat
 $\pm 10 \text{ l alcohol (acc. vrij.)}$

Vergelijkt men deze methode met de chemische kali-bepaling, dan blijkt dat, wanneer men deze laatste in duplo doet, door hetzelfde personeel in een week tijds slechts 285 bepalingen gedaan kunnen worden. Deze methode heeft het voordeel in 4 dagen afgeloopen te zijn, daartegenover staat dat men met de Aspergillus-methode met hetzelfde personeel bijna viermaal zooveel bepalingen kan verrichten terwijl, doordat de bepaling in drievoud gedaan wordt, de kans, dat een bepaling ten gevolge van infectie geheel onbruikbaar is, vrijwel uitgesloten is.

Vereenvoudiging der methode

Doordat de mycelia, dank zij het looien met formaline, heel stevig zijn, is het zeer wel mogelijk om in plaats van papieren filters, fijnmazige nichroom-gaasjes te gebruiken. Deze behoeven slechts af en toe op constant gewicht gecontroleerd te worden, waardoor het dagelijks wegen der blanco filters vervalt, terwijl bovendien het uitwasschen zoowel als het drogen gemakkelijker zal gaan.

Ook zou het, gezien het feit, dat reeds op het oog zeer duidelijke verschillen zijn waar te nemen in de dikte en vorm van het schimmeldek, niet uitgesloten zijn, dat men, wanneer het er om zou gaan om alleen maar uit te maken of een grond al dan niet bemesting noodig heeft, dit op het oog zou kunnen beoordeelen.

In dat geval zou kunnen worden volstaan met de proef in duplo te doen. Het afwegen en vullen blijft hetzelfde, het afwerken vervalt en komt er op neer dat dagelijks 400 kolfjes met een standaardserie vergeleken worden. Dit kunnen twee meisjes gemakkelijk in twee uur verrichten. De duur van de bepaling is hiermede tot 5 dagen teruggebracht, de kosten aan chemicaliën tot op twee derden, in plaats van 7 meisjes kunnen nu 4 meisjes in 5 dagen 1200 monsters in duplo onderzoeken.

Ten einde een indruk te krijgen van de mogelijkheden en beperkingen van deze werkwijze werd van een aantal grondmonsters op het oog het fosphaatgehalte geschat. Hiertoe werd per kolfje van 100 cm³ ¹⁾ bevattend 40 cm³ cultuurvloeistof 3,75 g luchtdroge grond toegevoegd. Na 4 dagen bij 37° C werd de proef afgebroken en vergeleken met een standaardserie, die stijgende hoeveelheden ammoniumphosphaat bevatte. De beoordeeling was als volgt:

0—20 mg P ₂ O ₅ in 100 g grond	zeer arm
20—30 mg P ₂ O ₅	weinig
40—60 mg P ₂ O ₅	voldoende
80—120 mg P ₂ O ₅	ruim voldoende
120—180 mg P ₂ O ₅	flinke fosphaat-voorraad
200 en meer	zeer fosphaatrijk

Onderzocht werden 13 grondmonsters, wat voor een definitieve beoordeeling ongetwijfeld onvoldoende is; de proef was echter slechts ter oriëntering bedoeld.

¹⁾ De beoordeeling in deze kleine erlenmeyers is minder scherp dan in de erlenmeyers van 300 cm³. Deze zijn dan ook voor dit werk te prefereren, eventueel voorzien van een breede monding.

Het resultaat was het volgende:

Zeer arm	Weinig	Voldoende	Ruim voldoende	Flinke voort.	Zeer rijk
Hooghalen 104761	105314	105293 106103	104868 106101	106100 138865	138871 138882 142042 142041

De beoordeeling van het Bedrijfslaboratorium voor Grondonderzoek was de volgende:

Hooghalen (6) 105314 (17)	104671 (19)	105293 (37) 106103 (43)	104868 (86) 106101 (73) 106100 (88)	138865 (155) 138882 (178) 142042 (200) 138871 (221)	142041 (241)
------------------------------	-------------	----------------------------	---	--	--------------

(De cijfers tusschen haakjes geven de P citr-getallen aan).

Niettegenstaande bij de beoordeeling geen rekening was gehouden met de verschillende eischen, die klei- en zandgronden stellen en ook de indeeling niet op een zoo uitgebreid feitenmateriaal steunde als wenschelijk is, kan niet ontkend worden, dat op deze betrekkelijk primitieve wijze toch een groepeerings is verkregen, die met de op het Bedrijfslaboratorium langs chemischen weg verkregen waarden een niet onbevredigende overeenkomst vertoont.

Alhoewel het wellicht noodig zal blijken de waardeering beter aan de eischen, die de gewassen stellen, aan te passen, heeft deze voorloopeige proef toch aangetoond, dat men op het oog duidelijk en snel een zestal trappen kan onderscheiden; hetgeen ongetwijfeld voor praktijkvoorlichting in de meeste gevallen voldoende zal zijn. In het bijzonder bij de kalibepaling zal de beschikking over een goedkoope, eenvoudige methode goede diensten kunnen bewijzen, speciaal in die gevallen, waar het meer aankomt op de directe beantwoording van de vraag of al dan niet bemest moet worden, terwijl het minder op een nauwkeurige vaststelling van de hoeveelheden kali gaat.

Stelt men het aantal bepalingen, dat door een zeker aantal meisjes in een week in duplo gedaan kan worden langs chemischen weg op 100, dan vindt men voor de andere methoden met hetzelfde aantal werkkrachten het volgende:

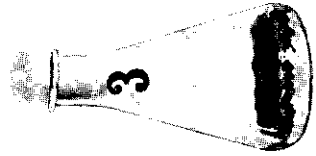
Chemisch in duplo	100 bep.
Chemisch in enkelvoud	160 „
Aspergillus-methode, gewichts-analytisch in triplo	350 „
Idem in duplo	520 „
Aspergillus-methode, geschat, in duplo	620 „



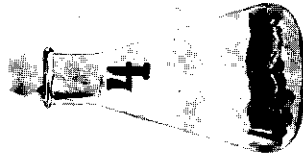
10 mg



40 mg



80 mg



120 mg



170 mg



220 mg

Fig. IV *Phosphatbepaling met Aspergillus niger*

Het is duidelijk dat men deze 6 stadia op het oog gemakkelijk kan onderscheiden. (De aangegeven getallen geven de hoeveelheid P_2O_5 in 100 g grond).

Uit het bovenstaande blijkt duidelijk, dat met de *Aspergillus*-methode, indien deze inderdaad een redelijk verband met den toestand te velde aanwijst (wat op het oogenblik nog in onderzoek is), een belangrijk grootere capaciteit bereikt kan worden dan met de chemische methode en uit dien hoofde een snelle en goedkope voorlichting van de landbouwers betreffende de fosphaat- en kalibehoeften van hun akkers op uitgebreide schaal mogelijk zou worden.

V. Overzicht der verkregen resultaten

Met het oog op de mogelijkheid om met behulp van de schimmel *Aspergillus niger* op eenvoudige, snelle en goedkope wijze de fosphaat- en kalibehoeftes van den grond te bepalen, werd over dit onderwerp een onderzoek ingesteld.

De tot nu toe gebruikte voedingsoplossing voldeed niet aan de voornaamste eischen, die men daaraan, vooral bij de fosphaatbepaling, moet stellen, namelijk, dat de pH bij verschillende fosphaatconcentraties vrijwel constant blijft. Het bleek, zoowel uit de literatuur als uit eigen onderzoeken, dat de eind-pH's der oplossingen, nadat de schimmel volgroeid is, steeds schommelen (tusschen 3,5 en 1,3), afhankelijk van het fosphaatgehalte der onderzochte gronden. Het gevolg hiervan is, dat in feite het fosphaat in den grond bij verschillende pH's geëxtraheerd wordt, wat aanleiding kan zijn tot groote verschillen.

Ook in andere opzichten bleek de cultuuroplossing niet optimaal en voor verbetering vatbaar te zijn.

Ons eerste streven is dan ook geweest de samenstelling van de cultuuroplossing dusdanig te wijzigen, dat deze beter aan de te stellen eischen voldeed en ook voor de P-bepaling in kalk en humus-houdende gronden gebruikt zou kunnen worden, wat tot nu toe niet mogelijk was.

De door NIKLAS en medewerkers gebruikte *Aspergillus*-stam is aangepast aan een pH van omstreeks 2½, terwijl voor een goeden groei de toevoeging van 0,1 % pepton vereischt is.

Een door ons geïsoleerde *Aspergillus niger*-stam bleek beter te groeien zonder pepton, terwijl de optimale pH omstreeks 3,5 lag. Met het oog op het feit, dat de cultuuroplossing zich veel beter laat bufferen bij een pH van omstreeks 3,5 dan bij 2,5, terwijl het een voordeel is, wanneer de cultuurvloeistof niet een gemakkelijk aantastbare stikstofbron als pepton bevat, werd besloten ook deze stam bij het onderzoek te betrekken. Tevens bleek het wenschelijk de hoeveelheden van enkele der in de voedingsoplossing aanwezige micro-elementen te verhoogen, namelijk de hoeveelheid ijzer van 0,0001 % op 0,0005 % te brengen, de hoeveelheid zink te verdubbelen tot op 0,0002 %, terwijl de toevoeging van 0,0001 % Mn als MnSO_4 voor den stam

NIKLAS de groei zeer duidelijk bevorderde. Een poging om het drogen en wegen te vervangen door een eenvoudige polarimetrische bepaling van de door de schimmel verbruikte suiker had, althans voor grondonderzoek, geen succes.

Het onderzoek naar de factoren, die de pH-veranderingen in de cultuur-vloeistof beheerschen, bracht aan het licht, dat hiervoor in de eerste plaats het als N-bron gebruikte ammoniumsulfaat verantwoordelijk was. Voor den stam Niklas (Poschenrieder) bleek een vervanging door andere N-bronnen nadeelig te werken, de stam Groningen echter kon zich uitstekend ontwikkelen met 0,4 % ureum als N-bron, de pH-daling was hierdoor reeds aanmerkelijk gereduceerd, nl. van 3,41 tot 2,56 met ureum, tegen 3,62 tot 1,84 met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Bij het onderzoek van de vraag of de resteerende pH-daling wellicht nog kan worden verminderd door inplaats van de sulfaten van Mg en K, de citraten te gebruiken, bleek, dat op deze wijze een tekort aan S ontstond.

Toen getracht werd dit op te heffen door toevoeging van verschillende S-bronnen bleek, dat door toevoeging van CaSO_4 het myceliumgewicht veel meer toenam dan de toegevoegde hoeveelheid S deed verwachten. Bovendien werd de oplossing aanmerkelijk zuurder, wat er op wees, dat meer Ca⁺⁺ opgenomen werden dan SO_4^{--} .

De toevoeging van 1,25 g Ca-citraat per kolfje met 75 cm³ vloeistof aan de overigens volledige voedingsoplossing deed het myceliumgewicht met ± 30 % stijgen, terwijl de pH-daling slechts 0,54 bedroeg tegen 1,64 zonder Ca-citraat.

Door deze Ca-citraattoevoeging werd dus niet alleen bereikt, dat de schimmel voor zijn Ca-voeding onafhankelijk was geworden van de wisselende hoeveelheden kalk in de toegevoegde gronden, maar tevens, dat de cultuur-vloeistof veel beter gebufferd was.

Ook in een ander opzicht bleek de gebruikte voedingsoplossing niet optimaal te zijn. Door KIESZLING was reeds gewezen op den stimuleerenden invloed van de toevoeging van kleine hoeveelheden humuszuur op den groei van *Aspergillus niger*, terwijl door NIELSEN hetzelfde was aangetoond voor de groeistof *Rhizopine*. Het bleek inderdaad, dat ook in de door ons gebruikte cultuurvloeistof door toevoeging van *Rhizopine* een myceliumgewichtsvermeerdering van 20 % werd verkregen, terwijl door de toevoeging van humus de opbrengst zelfs met ± 40 % vermeerderde: mengsels van humaat en *Rhizopine* hadden eenzelfde uitwerking als humaat alleen.

De voor het grondonderzoek op P_2O_5 gebruikte voedingsoplossing werd tenslotte op de volgende wijze samengesteld:

Saccharose	10 %
Citroenzuur	1 %

Ureum	0,4 %
K ₂ O als K ₂ SO ₄ . . .	0,02 %
MgSO ₄	0,03 %
Cu als CuSO ₄	0,00005 %
Fe als FeSO ₄	0,0005 %
Zn als ZnSO ₄	0,0002 %
Mn als MnSO ₄	0,0001 %
Ca-citraat	1,66 % (= 1,25 g per kolfje met 75 cm ³ cultuurvloeistof)
Humuszuur	0,017% (= 12,5 mg per kolfje enz. als Na-humaat)

Het onderzoek van den grond op fosphaatgehalte geschiedde in erlenmeyers van 300 cm³ met 75 cm³ vloeistof, waarin 7,5 g luchtdroge grond was gesuspenderd.

Voegt men aan deze cultuuroplossing stijgende hoeveelheden fosphaat NH₄H₂PO₄ toe, dan oogst men stijgende hoeveelheden mycelium, terwijl de pH slechts weinig verandert (maximaal met 0,34). In de oude cultuuroplossing daarentegen kan deze pH-verandering onder dezelfde omstandigheden tot het drievoudige stijgen.

Bij het onderzoek van een 68-tal gronden uit de praktijk met de door ons gewijzigde cultuuroplossing was de gemiddelde pH-verandering slechts 0,14.

Bij vergelijking van de resultaten van het onderzoek op P₂O₅-gehalte van een 20-tal gronden met de nieuwe en de oude cultuurvloeistof bleek naast overeenstemmende waarden ook een aantal uiteenlopende waarden verkregen te worden, waarvan de oorzaak voornamelijk te zoeken was in de lage eind-pH's, die in de slecht gebufferde oorspronkelijke vloeistof van TRISCHLER ontstonden, wanneer de gronden veel fosphaat bevatten.

Bij het vergelijkend onderzoek van een aantal praktijk gronden volgens Neubauer, de citroenzuur-methode en de Aspergillus-methode bleek, dat er tusschen de citroenzuurmethode en de Aspergillus-methode in de meeste gevallen een behoorlijke overeenkomst bestond; door de Aspergillus wordt echter in een aantal gevallen een gedeelte van de voor nalevering beschikbare fosphaten geassimileerd, waardoor deze waarden dan hooger uitvallen dan de P citr-cijfers.

Bij een 56-tal gronden, afkomstig van proefvelden in verschillende deelen des lands, kwamen de aanwijzingen, welke aan de hand van de Aspergillus-cijfers over den fosphaattoestand verkregen werden, doorgaans bevredigend met de beoordeeling op grond van de proefveldresultaten overeen.

Gezien de goede reproduceerbaarheid der bepalingen onderling en de eenvoud der uitvoering, is het de overweging waard om aan de *Aspergillus*-methode, op de bovenbeschreven wijze gewijzigd, bij het praktijk-onderzoek van de fosphaatbehoefte van den grond een plaats in te ruimen.

Wat betreft de *kalibepaling* bleek, dat toevoeging van Na-zouten wel degelijk van invloed is op de ontwikkeling van de schimmel. Toevoeging van 5 millimol./L Na_2SO_4 deed het myceliumgewicht met 30 % stijgen; geconstateerd werd, dat deze stimuleerende werking *alleen* optreedt bij aanwezigheid van kalium; met Na-zouten alleen vindt geen noemenswaardige groei plaats.

Aan de cultuurvloeistof werd daarom in het vervolg steeds 5 millimol./L Na_2SO_4 toegevoegd.

Voor de kaliumbepaling is het wenschelijk de saccharose om te kristalliseeren, daar het handelsproduct wisselende hoeveelheden kali bevat.

Voor het onderzoek van den grond op kalibehoefte werd gebruik gemaakt van 300 cm³ erlenmeyers met 75 cm³ voedingsvloeistof, waarin 6,25 g luchtdroge grond.

Een vergelijkend onderzoek van verschillende met K bemeste proefperceelen gaf goed overeenstemmende uitkomsten, terwijl bleek, dat de gevonden kali-waarden onafhankelijk waren van het feit, of de perceelen al dan niet bekalkt waren.

Tenslotte werden ter orienteering van een beperkt aantal gronden de cijfers, welke met de *Aspergillus*-methode verkregen waren, vergeleken met Neubauer-getallen en de langs chemischen weg verkregen K-gehalten of K-getallen. Hierbij bleek, dat stijgende kali-bemestingen zich in de op verschillende wijzen verkregen cijfers meer of minder duidelijk afspiegelen en dat er in een aantal gevallen een nauw verband tusschen deze cijfers bestond.

Wat betreft de reproduceerbaarheid der resultaten bleek de *Aspergillus*-methode zeer bevredigend en benaderde in dit opzicht de chemische methode.

Bij een 24-tal grondmonsters, afkomstig van proefvelden in verschillende deelen des lands, bleken de aanwijzingen, welke aan de hand van de *Aspergillus*-cijfers over den kalitoestand verkregen werden, in het algemeen een behoorlijke overeenkomst met de beoordeeling op grond van de proefveld-resultaten te vertoonen.

Een berekening van de aan de *Aspergillus*-methode verbonden *arbeid en kosten* toonde aan, dat men met hetzelfde personeel, werkende met eenzelfde graad van nauwkeurigheid, 3—5 maal zooveel bepalingen kan doen als op het oogenblik langs chemischen weg.

Een toetsing der verschillende methoden ter onderlinge vergelijking op grootere schaal, die in gang is, zal nader kunnen leeren of de *Aspergillus*-methode, vooral in die gevallen, waarin met een eenvoudige bepaling kan

worden volstaan, in de reeds lang gevoelde behoefte naar een goedkoope en snelle werkwijze zal kunnen voldoen.

Tenslotte betuigen wij ook langs dezen weg onze groote erkentelijkheid aan de „Stichting tot verruiming van werkgelegenheid voor Academisch gevormden”, welke steun dit onderzoek mogelijk gemaakt heeft.

De Heeren Prof. Dr. O. DE VRIES, Dr. C. W. G. HETTERSCHIJ en Dr. F. VAN DER PAAUW danken wij voor hun bereidwilligheid om het manuscript kritisch door te lezen en voor de waardevolle opmerkingen die zij daarbij gemaakt hebben.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Methode-NIKLAS' zur Bestimmung der Phosphat- und Kali-Bedürfnisse von Ackerböden mit Hilfe von *Aspergillus niger*, wurde einer kritischen Untersuchung unterworfen.

Es zeigte sich, dass die von NIKLAS und Mitarbeitern zusammengestellte Nährlösung grosse pH-Schwankungen aufwies, wegen der geringen Pufferkapazität derselben. Weil das pH, wobei die Phosphatbestimmung stattfindet, vorwiegend die Menge des gelösten Phosphats bestimmt, ist es für eine zuverlässige Bestimmung unbedingt notwendig dass Anfangs- und End-pH weitgehend an einander gleich sind.

Daneben beeinflusst der wechselnde Kalkgehalt der Böden das Wachstum des Pilzes auf zwei Wegen: erstens durch die Änderung der Pufferung des Kulturmediums und zweitens weil Kalzium für den Pilz ein Nährstoff ist, der in der gebrauchten Nährlösung in ungenügender Menge anwesend ist.

Auch wurde konstatiert, dass die Menge des gebildeten Myzels durch die Anwesenheit von bestimmten humösen Stoffen merklich stimuliert wird.

Die pH-Änderungen konnten beträchtlich herabgesetzt werden, wenn statt 0,6 % Ammoniumsulfat, 0,4 % Ureum als Stickstoffquelle benutzt wird. Allerdings war dies nur möglich, wenn an Stelle des üblichen *Aspergillus*-Stammes *Poschenrieder* der von uns isolierte Stamm Groningen herangezogen wurde, der sich dadurch unterscheidet, dass er sich mit Ureum und ohne Pepton vorzüglich entwickelt.

Eine weitgehende Unabhängigkeit vom Ca-Gehalt des Bodens und zugleich eine bessere Pufferung der Nährlösung in der Nähe von pH 3,5, das optimale pH unseres Pilzstammes, wurde erreicht durch Hinzusetzen von 1,65 % Kalziumzitrat zur Nährlösung. Die pH-Änderungen, welche anfänglich bis zu 1,8 pH betrugen, zeigten sich bei der Untersuchung einer Anzahl Böden im Mittel bis auf 0,14 zurückgedrängt.

Durch Zusatz von 12,5 mgr Huminsäure pro Erlenmeyer wurde eine

Quelle von Unregelmässigkeiten beseitigt. Einige Böden bildeten durch Hinzufügung dieser kleinen Menge Humus sogar 9—40 % mehr Myzel.

Etwa 70 Böden verschiedener Herkunft wurden mit Hilfe des *Aspergillus*, Stamm Groningen, und der geänderten Nährlösung untersucht.

Die in triplo erhaltenen Zahlen zeigten einen mittleren Fehler von 2—3 %, so dass die Bestimmungen eine sehr gute Reproduzierbarkeit aufweisen. An der Hand der erhaltenen Zahlen liessen die Sandböden sich mühelos in vier Gruppen mit abnehmender Phosphatbedürftigkeit unterbringen, welche zu einer Beurteilung der Düngebedürftigkeit in der Praxis durchaus ausreichen werden. Die so erhaltene Beurteilung war befriedigend mit den Ergebnissen der Versuchsfelder im Einklang. Die Anzahl der untersuchten Lehm Böden war zu gering um zuverlässige Grenze feststellen zu können, obwohl die Umrisse der Phosphatlage sich ziemlich deutlich hervorhoben.

Bei den Kalibestimmungen wurde festgestellt dass, bei Anwesenheit von Kalium, Natriumsalze (5 m.mol pro/L) eine fördernde Wirkung auf die Entwicklung des Myzels ausüben (bis zu 30 % Mehrertrag). Auch die Kali-Bestimmung mit der geänderten Nährlösung zeigte eine gute Reproduzierbarkeit (mf. 2—3 %).

Die Kalibedürfnisse von einer beschränkten Anzahl Versuchsfelder wurde mittels der *Aspergillus*-Methode bestimmt und mit den Resultaten der Neubauer, K-Gehalt und K-Zahl-Bestimmungen verglichen. Es zeigte sich durchaus eine ziemlich gute, bisweilen sogar eine schlagende Übereinstimmung der auf verschiedenem Wege gefundenen Zahlen.

Schliesslich wurde der Aufwand an Material und Arbeitskraft, welche zur Ausführung der *Aspergillus*-Methode benötigt sind, berechnet.

Es ist zu erwarten dass, falls die hier erhaltenen Ergebnisse durch die in Angriff genommenen Untersuchungen in grösserem Masstabe bestätigt werden, die *Aspergillus*-Methode zu den billigsten und zugleich am besten reproduzierbaren Methoden gehören wird, welche wir zur massalen Auffindung des Phosphat- und Kali-Bedürfnisses des Bodens für die Praxis besitzen.

LITERATUUR

1. W. BUTKEWITSCH. Die Kultur des Schimmelpilzes *Aspergillus niger* als Mittel zur Boden-Untersuchung. (Russ.) *Journ. f. Landwirtschaft* Bd. 10, 1909 p. 136—141. *Ref. C. Bl.f. Bakt. II.* Bd. 25 p. 314.
2. R. SCHNÜCKE. Die Phosphorstoffwechsel einiger Pilze mit besonderer Berücksichtigung von *Aspergillus niger*. *Bioch. Zeitschr.* 153, p. 372—1924.
3. A. NIETHAMMER. Über das Gesetz vom Minimum bei Pilzkulturen. *Bioch.Z.* 165. 168—195, 1925.
4. W. BENECKE en H. SÖDING. Beiträge zum Ausbau der mikrobiologischen Bodenanalyse. *Zeitschr. Pflanzen Ern. u. D.* A 10 p. 129, 1927—'28.
5. Een samenvatting van dit werk vindt men in Honcamp, *Handb. d. Pflanzenern. und Düngerlehre*. Dl. I, p. 849. H. NIKLAS, *Der Ausbau der Aspergillusmethode . . . im Agrikulturchemischen Institut, Weihenstephan.*
6. G. LIEBSCHER. Untersuchungen über die Bestimmung des Düngerbedürfnisses der Ackerböden und Kulturpflanzen. *J. f. Landw.* 43, 46—216, 1895.
7. E. H. PRINGSHEIM. Über den Einfluss der Nährstoffmengen auf die Entwicklung der Pilze. *Z. f. Botanik* 6, 1914 p. 577—624.
8. R. MEYER. Zum Ertragsgesetz bei *Aspergillus niger*. *Bioch. Z.* 199 p. 177, 1928.
9. W. C. VISSER. Kalktoestand en oogstopbrengst. *Versl. Landb. Onderz. R. L. P.* Nr. 44 A, 1938.
10. F. VAN DER PAAUW. Over de samenhang tusschen groeifactoren en opbrengst. *Landbuk. Tijdschrift* 50, 1938.
11. O. DE VRIES. Opbrengstcurven en opbrengstwetten; de wisselwerking der groeifactoren. *Landbuk. Tijdschrift* 51, 1939.
12. O. DE VRIES. Ertragskurven, Ertragsgesetze und die Bedeutung der gegenseitigen Beeinflussung der Wachstumsfaktoren. *Zeitschr. f. Bodenk. u. Pflanzenern.* 14 (59) p. 1—10, 1939.
13. R. MEYER. Zum Ertragsgesetz bei *Aspergillus niger*. *Arch. f. Mikrobiologie* 1 p. 277, 1930.
14. F. C. GERRETSEN. Resultaten van eenige veldproeven over het enten van lucernezaad met bacterienpreparaten. *Landb. Onderz. R. L. P.* 9 A p. 87, 1933.
15. NIKLAS in Honcamp, *Handb. d. Pflanzenern. und Düngerlehre*, Dl. I p. 850.
16. TRISCHLER. Ern. physiol. Studien a. d. Schimmelpilz *Asp. niger*. Diss. München, 1930.
17. G. VILSMEYER. Der Einfluss des Kalkgehaltes der Böden bei der Untersuchung auf ihre Phosphorsäure Bedürftigkeit mittels *Aspergillus niger*. *Z. Pfl. u. D.* A 31 p. 279, 1933.
18. H. SÖDING. Die *Aspergillus*methode. *Z. Pfl. Ern. u. D.* A 20 p. 129—130, 1931.
19. H. NIKLAS, G. VILSMEYER, H. POSCHENRIEDER. Der Einfluss des Kalkgehaltes auf das *Aspergillus* Wachstum. *Z. Pfl. Ern. und D.* A 24 p. 167, 1932.
20. L. E. KIESZLING. Über die Beeinflussung der *Aspergillus*methode durch Humussäure. *Z. Pfl. Ern. u. D.* A 21 p. 86—104, 1931.